

**UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON GLUTATHION
IN DER HEFE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE:
ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON
GLUTATHION-DEFEKT MUTANTEN**

Manfred Kistler



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554616_0050

UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON GLUTATHION IN DER HEFE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE:
ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON GLUTATHION-DEFEKT MUTANTEN

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der LMU-München

vorgelegt von
Manfred Kistler
München im August 1986

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. U. Hagen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 11. 1986

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Material und Methoden</u>	
2.1. Hefestämme	10
2.2. Medien und Puffer	12
2.3. Chemikalien und Enzyme	13
2.4. Genetische Analyse	15
2.5. Bestrahlungsbedingungen	16
2.6. Plattendiffusionstest (Hemmhof-Schnelltest)	16
2.7. Mutationstestungen	18
2.8. Nachweis der Atmungskompetenz	20
2.9. Biochemische Bestimmungsmethoden	
2.9.1. Gesamt-Thiol und Glutathionbestimmung	20
2.9.2. GSH-S-Transferasen	22
2.9.3. γ -Glutamyl-Transpeptidase	23
2.9.4. Glutathion-Reduktase	24
2.9.5. γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase	25
2.9.6. GSH-Synthetase	26
2.9.7. GSH-Vorstufenaufnahme	28
2.10. Trennverfahren in der Aminosäureanalyse	28
2.11. Proteinbestimmung	29
2.12. Fermentation	29
2.13. Abkürzungen	31

3. Ergebnisse

3.1.	Isolierung und Charakterisierung von GSH-Defizienz Mutanten	
3.1.1.	Isolierung	33
3.1.2.	Beschreibung phänotypischer Eigenschaften	
3.1.2.1.	Glutathion-Gehalte	35
3.1.2.2.	Wachstumscharakteristika	36
3.1.2.3.	Einfluß des GSH (bzw. der GSH-Defizienz) auf die Zellatmung	38
3.1.2.4.	Morphologische Merkmale und Knospungsverhalten	38
3.2.	Genetische Charakterisierung der <u>gsh</u> ⁻ Mutanten	
3.2.1.	Kreuzungsversuche und Tetradenanalysen	40
3.2.1.1.	Kreuzungen mit dem Wildtyp	41
3.2.1.2.	Komplementationsanalyse	44
3.3.	Biochemische Charakterisierung der <u>gsh</u> ⁻ Mutanten	49
3.3.1.	Oxido-Reduktions-Status und Glutathion Reduktase	50
3.3.2.	Aufnahmekinetiken und Zufütterung von GSH-Vorstufen	51
3.3.2.1.	Aufnahmekinetik-Studien	52
3.3.2.2.	Zufütterungsversuche	53
3.3.3.	γ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase (γ -GCS)	55
3.3.4.	Glutathion-Synthetase (GSH-Synthetase)	60
3.3.5.	γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GTP)	61
3.3.6.	GSH-S-Transferasen	63
3.3.7.	Möglichkeiten zur Kompensation der GSH-Defizienz	65

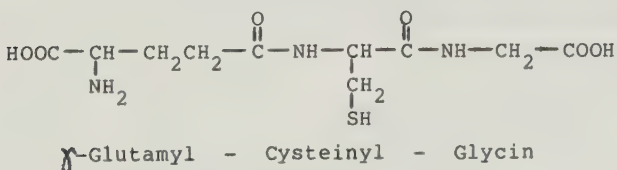
3.4.	Untersuchungen über die Rolle von GSH im Fremd- stoffmetabolismus und dessen Beeinflußung sowie über die Schutzwirkung gegenüber ionisierenden Strahlen	
3.4.1.	Chemikalienversuche	
3.4.1.1.	Reaktion von GSH mit Nitrosoguanidinen (NG)	68
3.4.1.2.	Bioinaktivierung durch GSH	82
3.4.2.	Bestrahlungsversuche mit ionisierenden Strahlen	90
3.4.2.1.	Bestrahlungsversuche mit Haplonten	94
3.4.2.2.	Bestrahlungsversuche mit Diplonten	97
4.	<u>Diskussion</u>	
4.1.	Charakterisierung von <u>gsh⁻</u> Mutanten aus <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	100
4.2.	Untersuchungen über die Schutzwirkung von GSH mit chemischen Substanzen und ionisierenden Strahlen	
4.2.1.	Fremdstoffmetabolismus	109
4.2.2.	Radioprotektion durch GSH	116
5.	<u>Zusammenfassung</u>	120
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	125

1. E I N L E I T U N G

Das Tripeptid Glutathion (L- γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin; GSH) wurde von de REY-PAILHADE (1888) erstmals als schwefelhaltige Substanz in Hefe beschrieben und von HOPKINS (1921) ebenfalls aus Hefe isoliert. Es ist in tierischen Geweben und Körperflüssigkeiten sowie in pflanzlichen Zellen und Mikroorganismen weit verbreitet. In tierischen Zellen liegt seine Konzentration im millimolaren Bereich (1-12 mM); es stellt den höchsten Anteil der sog. Nicht-Protein-Thiole (NPSH), zu denen auch Cystein (0,2-0,4 mM; REED, 1983), Cystin und in geringer Konzentration Metabolisierungsprodukte des GSH (γ -Glutamyl-Cystein und Cysteinyl-Glycin) gehören (EDGREN et al., 1980; MEISTER und ANDERSON, 1983; WARD, 1983).

Die Zahl der natürlich vorkommenden Oligopeptide ist relativ gering. Sie haben zumeist eine biologische Funktion und sind nicht in den normalen Proteinstoffwechsel eingebunden (LEHNINGER, 1969). GSH als das am häufigsten vorkommende niedermolekulare Peptid zeigt eine strukturelle Eigenheit, die es vor proteolytischem Abbau schützt: die peptidische Bindung zwischen dem Cystein- und dem Glutamatrest am γ -C-Atom des Glutamats (KROHNE-EHRICH und UNTUCHT-GRAU, 1976).

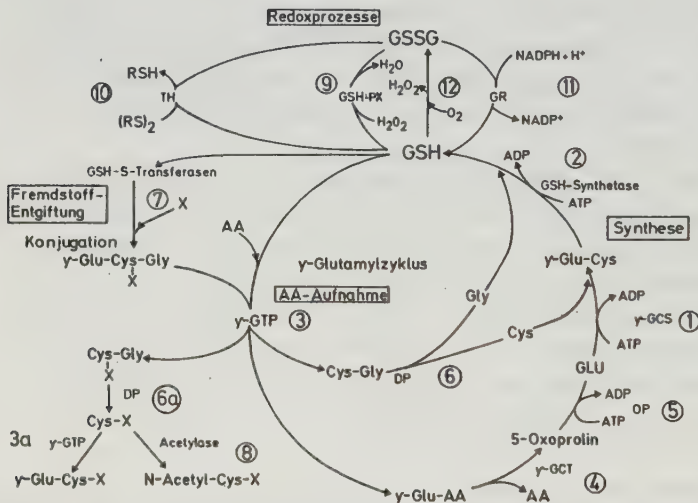
Die Vorstufen von GSH, die Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin sind nicht essentiell. Das daraus RNA-unabhängig synthetisierte GSH (Figur 1.1) jedoch ist für die Aufrechterhaltung vieler zellulärer Vorgänge von entscheidender Wichtigkeit (KOSOWER und KOSOWER, 1969; MEISTER, 1983).



Figur 1.1 Strukturformel des GSH

Die biologische Bedeutung des GSH erklärt sich durch den Besitz der freien Sulfhydryl-(SH-)gruppe des Cysteinrestes, die den reduzierenden Charakter ausmacht. Es sind inzwischen eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen in Säugerzellen bekannt (MITCHELL und RUSSO, 1983), die hier im einzelnen nicht behandelt werden können.

Um dennoch einen kurzen Überblick zu geben, wurden diese Funktionen in 3 Kategorien zusammengefaßt und anhand der Figur 1.2 nachfolgend erklärt.



Figur 1.2
Rolle des GSH im Zellmetabolismus (nach MEISTER und ANDERSON, 1983)

- [1] γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (γ -GCS)
- [2] Glutathion-Synthetase
- [3], [3a] γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GTP)
- [4] γ -Glutamyl-Cyclotransferase (γ -GCT)
- [5] 5-Oxoprolinase (OP)
- [6], [6a] Dipeptidase (DP)
- [7] GSH-S-Transferasen
- [8] Acetylase
- [9] GSH-Peroxidase (GSH-PX)
- [10] Transhydrogenasen (TH)
- [11] Glutathion-Reduktase (GR)
- [12] GSH Oxidation durch O_2 und freie Radikale

(1) Aminosäureaufnahme und GSH-Synthese

Die Aminosäure-(AA-)aufnahme ist gekoppelt mit dem komplexen γ -Glutamylzyklus (ALLISON und MEISTER, 1981; ORLOWSKI und MEISTER, 1970), zu dessen Aufklärung vorwiegend Untersuchungen an tierischen Zellen beigetragen haben (KOSOWER und KOSOWER, 1978; MEISTER, 1983).

γ -Glutamyl Transpeptidase (γ -GTP), welche vermutlich an der Außenseite der Membran lokalisiert ist, spaltet zunächst die γ -Glutamyl-Cystein-(γ -Glu-Cys-)Bindung des GSH (Reaktion [3] der Figur 1.2). Dies ist der erste Schritt im Abbauprozess (Hydrolyse) des GSH, an dem 4 Enzyme beteiligt sind. Der freigesetzte Glutamylrest wird mit einer Aminosäure beladen und als Dipeptid wieder in die Zelle geschleust. Auch das aus der GSH-Hydrolyse freigesetzte Cysteinyl-Glycin wird über die γ -GTP wieder eingeschleust [3]. Die Enzyme γ -Glutamyl-Cyclotransferase (γ -GCT [4]), 5-Oxoprolinase (OP [5]) und Dipeptidase (DP [6]) stellen dann wieder alle drei Vorstufen zur GSH-Resynthese oder zur Proteinsynthese bereit.

Die Vorstufen von GSH werden in die Zelle aufgenommen, das Tripeptid selbst nicht (DETHMERS und MEISTER, 1981).

Es kann jedoch in intakter Form ausgeschieden werden, um evtl. schädigende, oxidierende Agentien in unmittelbarer Umgebung der Zelle zu reduzieren (MEISTER und ANDERSON, 1983). Die Aminosäureaufnahme als eine wichtige Funktion des Zyklus und als zentrale Aufgabe der γ -GTP in höheren Eukaryonten (TATE und MEISTER, 1974) wird von einigen Untersuchern (McINTYRE und COURTHOYS, 1980) aus verschiedenen Gründen, auf die hier nicht eingegangen wird, stark angezweifelt.

Dem Zyklus zugeordnet wird auch die Synthese des GSH mit zwei enzymkatalysierten ATP-verbrauchenden Schritten. Durch die γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (γ -GCS) wird das Dipeptid L- -Glutamyl-L-Cystein (γ -Glu-Cys) aus L-Glutamat (Glu) und L-Cystein (Cys) gebildet. Dies geschieht über die Peptidbindung an der γ -Carboxylgruppe des Glutamats ([1] in Figur 2.2).



Die GSH-Synthetase katalysiert die peptidische Bindung von Glycin (Gly) an den Cysteinrest des γ -Glu-Cys [2].



Die an Leber- und Hefezellen durchgeführten Untersuchungen des Synthesewegs (SNOKE et al, 1953; SNOKE und BLOCH, 1952; SNOKE und BLOCH, 1955) wurden in der Folge auch für andere Eukaryonten und für Prokaryonten bestätigt (JOCELYN, 1958; SAMUELS, 1953).

Die GSH-Synthese wird durch Endprodukthemmung des ersten Syntheseschritts (MEISTER und ANDERSON, 1983), der auch der geschwindigkeitsbestimmende ist, kontrolliert.

(2) Redoxprozesse

Was SH- und SS-Gruppen als chemische Partner in Redoxreaktionen so geeignet macht, sind ihre Elektronenkonfigurationen um diese Gruppen. Durch die geringe Energie des niedrigsten unbesetzten Orbitals und die relativ hohe Energie des am höchsten besetzten Orbitals sind Schwefelverbindungen gleichermaßen gute Elektronenakzeptoren wie -donatoren. Darüber hinaus machen die d-Orbitale dieser Verbindungen sie zu sehr reaktiven Partnern.

Zu den GSH-abhängigen Redoxprozessen gehören die sog. Transhydrogenasereaktionen [10], durch die verschiedene biologische Aktivitäten reguliert und kontrolliert werden, wie z.B. Proteinsynthese, Proteinabbau, Enzymaktivierung und -inaktivierung, und Metabolismus der DNA-Vorstufen (MEISTER und ANDERSON, 1983). Aber auch die Entgiftung von Sauerstoff [12] und dessen reaktiven Radikalspezies (vorwiegend O_2^- und $\cdot\text{OH}$) sowie von H_2O_2 [9] und organischen Peroxiden (ROOH) kann über einen GSH-abhängigen Metabolismus laufen. Die genannten Radikalspezies können durch endogene (Metabolite des Nahrungsstoffwechsel) oder exogene Faktoren (ionisierende Strahlen, Medikamente und radikalgenerierende Chemikalien) erzeugt werden (z.B. BACHUR et al., 1979; REED, 1986).

Im Prinzip wird in all diesen Reaktionen GSH zum Dimeren GSSG oxidiert nach der Gleichung



In der Zelle steht das Gleichgewicht dieser Reaktion weit auf der Seite der reduzierten Form GSH (ca. 95-98%). Die Einstellung dieses Redoxgleichgewichtes wird durch das Flavoenzym Glutathion-Reduktase (GR) katalysiert. Es benötigt NADPH als Kofaktor. GSSG ist in höherer Konzentration für die Zelle toxisch, da es die Proteinsynthese hemmt (KOSOWER und KOSOWER, 1969). Es muß deshalb reduziert oder aus der Zelle geschleust werden. Es wurde vermutet, daß GSSG über die aktuelle Konzentration in der Zelle regulierend auf das Wachstum eingreifen kann (FAHEY et al., 1975).

(3) Fremdstoffentgiftung

Die Rolle von GSH in der Metabolisierung von Fremdstoffen ist unumstritten (CHASSEAUD, 1979; LARSSON et al., 1983). Der erste Schritt der Entgiftung von Fremdstoffen durch GSH geschieht durch eine sog. "Konjugations"reaktion, d.h. einer chemischen Reaktion zwischen einem Fremdstoff X und GSH [7]. Die Reaktionen von GSH mit elektrophilen Fremdstoffen lassen sich in fünf Reaktionstypen einteilen (KETTERER, 1982):

- a) Nukleophiler Austausch an einem gesättigtem C-Atom
- b) Nukleophiler Austausch an einem aromatischen C-Atom
- c) Nukleophiler Angriff mit Ringöffnung eines gespannten Rings
- d) Michael-Addition (an C-C-Doppelbindungen)
- e) Reaktion mit elektrophilen Kationen

Viele Konjugationsreaktionen können spontan erfolgen. Häufig werden spontan gut konjugierbare Substanzen auch enzymatisch an GSH gebunden (KETTERER, 1982). Diese Reaktionen werden katalysiert durch GSH-S-Transferasen (BOYLAND und CHASSEAUD, 1969; HABIG, 1983; HABIG et al., 1974; JAKOBY, 1978).

Das Konjugat GS-X kann in Folgereaktionen durch Glutamylabspaltung (durch γ -GTP [3a]), Glycinabspaltung (durch DP [6a]) und anschließender Acetylierung [8] in das Ausscheidungsprodukt "Merkaptursäure" überführt werden.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Einflußmöglichkeiten auf den intrazellulären GSH-Gehalt sowie die Untersuchung GSH-abhängiger Schutzfunktionen in der Hefe Saccharomyces cerevisiae. Von großem Vorteil erwies sich dabei die gut erforschte Genetik und Biochemie der Hefe sowie deren Eignung als biotechnologisch einsetzbarer Organismus. Außerdem besitzt Hefe einen außerordentlich hohen GSH-Gehalt, der nur noch mit dem von Leberzellen (ca. $6 \mu\text{Mol/g}$ Naßgewicht; SCHROEDER et al., 1939) zu vergleichen ist.

Die beschriebenen Funktionen von GSH im zellulären Stoffwechsel wurden vorwiegend an tierischen Zellen erforscht. Über die Bedeutung von GSH im Stoffwechsel von Saccharomyces cerevisiae gibt es nur wenige Untersuchungen. Die meisten beschäftigen sich mit der Charakterisierung der aus Hefe isolierten Enzyme des GSH-Stoffwechsels (MOOZ und MEISTER, 1967; PENNINCKX und JASPERS, 1982; PENNINCKX und JASPERS, 1985; RACKER, 1955; SNOKE, 1955) oder der Funktion von γ -GTP in der Aminosäureaufnahme (JASPERS und PENNINCKX, 1981; JASPERS et al., 1985; PAYNE und PAYNE, 1984; ROBINS und DAVIES, 1981).

Über die Existenz der beiden GSH-synthetisierenden Enzyme im γ -Glutamylzyklus der Hefe gibt es keinen Zweifel. Indes gab es bislang weder einen geeigneten biochemischen Ansatz zum Nachweis der Dipeptidsynthese noch gelang die Isolation und Reinigung der γ -GCS. Die GSH-Synthetase hingegen wurde isoliert, gereinigt und ist biochemisch gut charakterisiert (SNOKE, 1955; NISHIMURA et al., 1964; MOOZ und MEISTER, 1967).

MOOZ und WIGGLESWORTH (1976) postulierten die Existenz des gesamten γ -Glutamylzyklus in Saccharomyces cerevisiae, die von anderen Untersuchern aufgrund der von ihnen nicht nachweisbaren Enzyme γ -GCT [4] und OP [5] (JASPERS et al., 1985) bestritten wird. Auch die für Hefe postulierte Rolle von γ -GTP in der Aminosäuraufnahme (OSUJI, 1980) wurde von anderen in Frage gestellt (JASPERS et al., 1985; PAYNE und PAYNE, 1984; PENNINCKX et al., 1980; ROBINS und DAVIES, 1981). Außerdem gibt es einige Hinweise, daß die γ -GTP ein vakuoläres Enzym ist (JASPERS und PENNINCKX, 1984).

Untersuchungen über GSH-Redoxreaktionen und -Schutzeffekte in Hefe gibt es kaum (BRUNBORG, 1980).

Die Rolle als Redoxpartner und Strahlenschutzsubstanz ist für GSH allerdings weitgehend akzeptiert. Sie wird dessen Fähigkeit zugeschrieben, Radikale zu fangen ("Scavenger"-funktion), die durch ionisierende Strahlen oder verschiedene Medikamente (z.B. Adriamycin, Paraquat) und Nahrungsmittel erzeugt werden (AMES, 1983, 1984; BIAGLOW et al., 1983b; KAPPUS, 1986; REED, 1986; WARD, 1983), mehr jedoch seiner Fähigkeit, durch Abgabe des Wasserstoffs (H-Donation) die besonders bei der chemischen Ausheilung (Restitution; irreführend vielfach als "repair" bezeichnet) von biologisch wichtigen Molekülen von Bedeutung ist (BIAGLOW und VARNES, 1983; HARRIS, 1983). Diese Rolle spielt GSH wohl in allen Zelltypen bei Bestrahlung (mit ionisierenden Strahlen) unter geringer (Hypoxie) oder fehlender (Anoxie) zellulärer Sauerstoffsättigung. Unklar und auch zellspezifisch unterschiedlich ist sein Einfluß bei O_2 -gesättigten Bestrahlungsbedingungen bzw. auf den Sauerstoffverstärkungseffekt (BIAGLOW et al., 1983a; WARD, 1983), der eine Maßzahl darstellt für die unterschiedliche Empfindlichkeit einer Zelle (oder einer Zellpopulation) bei Bestrahlung unter oxischen und anoxischen Bedingungen.

Weiterhin ist es sehr wahrscheinlich, daß GSH im normalen Metabolismus eine Schutzfunktion gegen oxidative Schäden hat

(AMES, 1983, 1984; BIAGLOW et al., 1983b) - in vielen anaeroben Organismen konnte kein GSH nachgewiesen werden (FAHEY und NEWTON, 1982; MEISTER, 1983).

In den letzten Jahrzehnten hat GSH als wichtige Komponente bei der Entgiftung von Umweltchemikalien (als wichtige Funktion der Säugerleber) großes Interesse gefunden. Viele Fremdstoffe (Xenobiotika), die mit GSH reagieren, sind als mutagene und karzinogene Agentien bekannt (CHASSEAUD, 1979). Jedoch auch hier sind Untersuchungen über GSH-abhängige Fremdstoffmetabolisierung in Hefen kaum angestellt worden (SÜSSMUTH und LINGENS, 1969). Aufgrund dessen, daß GSH und GSH-S-Transferasen [7] evolutionär sehr alt und im Organismenreich ubiquitär sind, ist mit in Hefe und höheren Eukaryonten vergleichbaren Wirkungsmechanismen zu rechnen. Da auch die Chromatinstruktur der Hefe der höheren Eukaryonten sehr ähnlich ist, sollten die Ergebnisse aller DNA-bezogenen Prozesse weitgehend von Hefen auf höhere Eukaryonten übertragbar sein, d.h. die cytotoxischen und genotoxischen Eigenschaften von Substanzen in Säugern sollten auch in Hefe zu identifizieren sein.

LAU und Mitarbeiter (1980) konnten in verschiedenen pro- und eukaryontischen Mikroorganismen GSH-S-Transferasen nachweisen, jedoch nicht in Hefe, was den enzymatischen Prozess der GSH-abhängigen Entgiftung in diesem Organismus ausschließen würde.

Generell wurden Untersuchungen über den molekularen Mechanismus der Entgiftung kaum angestellt (HARRIS, 1983). Darüber hinaus gibt es nur wenige Arbeiten, in denen belegt wird, daß durch GSH die mutagene bzw. karzinogene Wirkung einer Substanz tatsächlich reduziert wird (RANNUG et al., 1978; SUMMER et al., 1980). Der Einsatz glutathiondefizienter Mutanten stellt einen Ansatz für derartige Fragestellungen dar. Solche Mutanten existieren bei Bakterien (APONTOWEIL und BERENDS, 1975a,b; FUCHS und WARNES, 1975; KERKLAAN et al., 1983, 1985) und menschlichen Zellen (MALAISE, 1983;

REVESZ, 1983), nicht jedoch bei Hefe. Ein großer Vorteil des Einsatzes genetisch im GSH-Gehalt manipulierter Hefezellen liegt in der Vermeidung chemischer GSH-Senkung mit deren ungewissen pleiotropen Nebeneffekten (HARRIS und BIAGLOW, 1972; WEBB, 1966). Die in Hefemutanten auf physiologische Weise bewirkte GSH-Defizienz (kein oder geringes Rest-GSH) wäre insbesondere geeignet für Untersuchungen von GSH-abhängigen Fremdstoffmetabolisierungen sowie Auswirkungen radikalbildender Prozesse durch Strahlen oder Medikamente.

Fernerhin ist die Hefe als Testorganismus für Mutagenitätstestungen von steigender Bedeutung. In Hefe existieren eine Anzahl von Teststämmen mit verschiedenen genetischen Endpunkten, in denen bereits eine große Zahl von genotoxischen Substanzen getestet wurde (ZIMMERMANN et al., 1984). Solche Stämme mit zusätzlichen GSH-Defekten wären wichtig, um Aussagen über den Aktivierungsweg (GSH-abhängig?) von Fremdstoffen treffen zu können, sowie über ihre cytotoxischen und genotoxischen Wirkungen unter veränderten Metabolisierungsbedingungen.

Und schließlich ließen sich mit genetisch bedingten GSH-defizienten Mikroorganismen die Auswirkungen von GSH-Depletion auf den γ -Glutamylzyklus untersuchen. Solche Untersuchungen sind aus experimentellen Gründen im Gesamtorganismus (Säugerzellen) oder dessen Zell-Linien schwieriger. Häufig beschränkt man sich deshalb nur auf die Schilderung der phänomenologischen Auswirkungen eines GSH-Defekts auf den Gesamtorganismus, wie etwa bei den erblich bedingten Enzymdefekten im GSH-Metabolismus des Menschen (MEISTER, 1982).

Auf der Grundlage der Isolierung, der genetischen und der biochemischen Charakterisierung von GSH-defizienten Mutanten wurde die Bedeutung des GSH hinsichtlich Fremdstoffmetabolisierung und Strahlenempfindlichkeit in Hefe untersucht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Hefestämme:

Diplonten:

D7 $\frac{a}{\Delta}$ $\frac{ade2-40}{ade2-119}$ $\frac{trp2-12}{trp2-27}$ $\frac{ilvl-92}{ilvl-92}$ $\frac{CYH}{cyh2}$ ¹⁾
(ZIMMERMANN, 1975)

¹⁾ Da das heterozygote Vorwärtssystem cyh/CYH in den vorliegenden Experimenten weder verwendet noch geprüft wurde, wird es in der Arbeit nicht erwähnt.

D7(rho⁰) $\frac{a}{\Delta}$ $\frac{ade2-40}{ade2-119}$ $\frac{trp2-12}{trp2-27}$ $\frac{ilvl-92}{ilvl-92}$ $\frac{CYH}{cyh2}$
(eigenes Isolat; identifiziert durch TTC und DAPI; siehe 2.8.)

MKD8 $\frac{a}{\Delta}$ $\frac{ade2-40}{ade2-119}$ $\frac{trp2-12}{trp2-27}$ $\frac{ilvl-92}{ilvl-92}$ $\frac{gsh1-1}{gsh1-1}$
(D7-Derivat mit GSH-Defizienz; eigene Arbeit)

MKD37 $\frac{a}{\Delta}$ $\frac{ade2-40}{ade2-119}$ $\frac{trp2-12}{trp2-27}$ $\frac{ilvl-92}{ilvl-92}$ $\frac{gsh1-2}{gsh1-2}$
(D7-Derivat mit GSH-Defizienz; eigene Arbeit)

Im Diplonten D7 und dessen gsh⁻ Abkömmlingen MKD8 bzw. MKD37 ist der homozygote Marker ilvl-92 geeignet zur Erfassung von Mutationen. Mit den heteroallelischen Markern trp5-12/trp5-27, die im Diplonten nicht intragenisch komplementieren, werden Genkonversionsereignisse erfaßt. Im Adenin-System liegen die heteroallelischen Marker ade2-40 und ade2-119 vor. Während der Marker ade2-40 im Haplonten und im homozygoten Diplonten absolute Adeninbedürftigkeit erzeugt, die mit einer Anreicherung eines roten Farbpigments verbunden ist (bedingt durch einen Block in der Adenin-Biosynthese), bewirkt der Marker ade2-119 nur eine sog. "leaky"-Ausprägung, bei der Zellen ohne Adenin-Supplementation noch wachsen können und nur schwach rosa anfärben. In heteroallelischen ade2-40/ade2-119 Diplonten findet eine sog. "intragenische Komplementation statt.

Mitotische Rekombinationsereignisse zwischen beiden Allelen oder dem Zentromer und dem nächst gelegenen Allel führen zu sog. Twinspot-Kolonien, bei der rosa-rot oder weiß-rosa bzw. weiß-rot sektorierte Kolonien entstehen. Andere Ereignisse, wie Genkonversion, Mutation oder Letalmutation können einheitlich rosa oder rote Kolonien erzeugen. Da die Gesamtheit dieser Ereignisse relativ häufig ist, können die aberranten Kolonien direkt auf den Überlebensplatten bestimmt werden.

Haplonten:

Wildtypstamm ohne Auxotrophiemarker:

S288-C L (Berkeley-Stammsammlung)

Ausgangsstämme der gsh⁻ Derivate:

BK RB1 L ade2-40 trp5-B ilv1-92

BK PA3 a ade2-119 trp5-A ilv1-92

(B. KUNZ, Toronto; diese Stämme wurden durch Sporulation aus dem D7 erzeugt)

gsh⁻ Derivate:

RB1-Abkömmlinge:

MK8 L ade2-40 trp5-B ilv1-92 gsh1-1 (Kurzbezeichnung "8")

MK37 L ade2-40 trp5-B ilv1-92 gsh1-2 (Kurzbezeichnung "37")

MK42 L ade2-40 trp5-B ilv1-92 gsh1-3 (Kurzbezeichnung "42")

(im Rahmen dieser Arbeit konstruiert)

PA3-Abkömmlinge:

MK11 a ade2-119 trp5-A ilv1-92 gsh1-4 (Kurzbezeichnung "11")

MK13 a ade2-119 trp5-A ilv1-92 gsh1-5 (Kurzbezeichnung "13")

Die Kurzbezeichnungen RB1 und PA3 stehen für BK RB1 und BK PA3; die Bezeichnungen trp5A bzw. trp5-B kennzeichnen die nicht identifizierten Gene trp5-12 und trp5-27.

Mit allen Markern in den haploiden Stämmen können ausschließlich Mutationsereignisse erfaßt werden.

2.2. Medien und Puffer:

Hefe-Vollmedium (YEPD; komplexes Wachstumsmedium):

2% Glukose, 2% Pepton, 1% Hefeextrakt, 1% Agar.

Ohne Agarzusatz wurde es als Flüssigmedium und bei Ersatz von Glukose durch 15% (w/v) Glyzerin als Aufbewahrungsmedium von Hefestämmen bei -20°C verwendet.

Synthetisches Vollmedium (SM):

2% Glukose, 1% Agar sowie Zugabe von 1,65 g YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids), 4,9 g Ammoniumsulfat, 5 mg Adenin, 10 mg Arginin, 60 mg Leucin, 20 mg Lysin, 10 mg Methionin, 10 mg Uracil sowie zur Erfassung der Auxotrophien der Stämme 10 mg Tryptophan, 60 mg Isoleucin und 30 mg Valin pro 1 l H₂O.

Glukose und Agar wurden zusammen autoklaviert, davon getrennt YNB und Ammoniumsulfat. Nach dem Autoklavieren wurden die Lösungen vereinigt, die Aminosäuren danach zugesetzt.

Synthetische Mangelmedien:

Wie SM, jedoch ohne Wachstoffsstoff für die jeweilige Bedürftigkeit (Tryptophan bzw. Isoleucin/Valin bzw. Adenin).

Diese Medien dienten zur Mutanten- und Konvertantenselektion für die bereits beschriebenen Marker der eingesetzten Stämme.

Präsporulationsmedium:

YEPD mit 8% Glukose (anstatt 2%).

Sporulationsmedium:

1% K-Acetat, 0,1% Hefeextrakt, 0,05% Glukose und 1% Agar.

Medien für die Fermentation:

batch-Kulturen:

YEPD (2% Glukose, 2% Pepton, 1% Hefeextrakt) mit 2‰ Antischaum-Zusatz.

Bei fed-batch Kulturen wurde die gewünschte Glukosekonzentration anfangs eingestellt und die aktuelle Konzentration durch diskontinuierliche Zufütterung erhalten.

Bei fed-batch Kulturen mit Ethanol als C-Quelle wurde Glukose durch Ethanol p.A. ersetzt und ebenfalls diskontinuierlich zugefüttert.

Die maximale Konzentration in der Kulturbrühe war nicht höher als 0,8% und wurde mittels Ethanolsonde ("on line") kontinuierlich bestimmt.

Für Kulturen mit Glyzerin als C-Quelle wurde Glukose durch Glyzerin (3% g/g) ersetzt.

Puffer:

Für die Mutationstestungen und Waschvorgänge wurde 0,05 M K_2HPO_4 -Puffer, pH 7,0 verwendet. Für die biochemischen Bestimmungen wurden Puffer unterschiedlicher Zusammensetzung, Molarität und pH-Wert benutzt, die dort (Punkt 2.9) beschrieben stehen,

2.3. Chemikalien und Enzyme:

Feinchemikalien:

Ethanol p.A.	MERCK, Darmstadt
L-Aminobutyrat	SIGMA, St. Louis
Na_2 -Adenosin-Triphosphat (ATP)	BOEHRINGER, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	MERCK, Darmstadt
1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol	EGA, Steinheim
1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol	ALDRICH, Steinheim
DEAE-Cellulose	PHARMACIA, Uppsala
4,6-Diaminidino-2-Phenylindol	SERVA, Heidelberg
Dithioerytrol	SERVA, Heidelberg
Dowex-Acetat 1x2	SERVA, Heidelberg
Dowex-1-Formiat	PHARMACIA, Uppsala
2,3,5-Triphenyl-Tetrazoliumchlorid	SIGMA, St. Louis
L-Cystein	MERCK, Darmstadt
L-Cysteiniumchlorid (Monohydrat)	MERCK, Darmstadt
Cystin	SIGMA, St. Louis
5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)	BOEHRINGER, Mannheim
Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz	MERCK, Darmstadt
L-Glutaminsäure	SIGMA, St. Louis

Na-L-Glutaminsäure	MERCK, Darmstadt
γ -L-Glutaminsäure-p-Nitroanilid	SERVA, Heidelberg
γ -Glutamyl-L-Aminobutyrat	Prof. Penninckx, Brüssel
Glutathion (reduziert)	BOEHRINGER, Mannheim
Glutathion (oxidiert)	BOEHRINGER, Mannheim
Glycin	SIGMA, St. Louis
Glycyl-Glycin	MERCK, Darmstadt
N-Acetyl-Cystein	BOFORS-NOBEL-PHARMA, Schweden
NADPH	BOEHRINGER, Mannheim
NADH	BOEHRINGER, Mannheim
N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff	SIGMA, St. Louis
N-Ethyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin	EGA, Steinheim
N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin	SERVA, Heidelberg
Ninhydrin	MERCK, Darmstadt
Ophtalmsäure	SERVA, Heidelberg
Phosphoenolpyruvat	BOEHRINGER, Mannheim
Sephadex G25 (fine)	PHARMACIA, Uppsala
Sulfonilamid	
(p-Aminobenzolsulfonamid)	SIGMA, St. Louis
<u>Radiochemikalien und Enzyme:</u>	
ADH-Testkit zur Ethanol-Bestimmung	BOEHRINGER, Mannheim
Alkohol-Dehydrogenase	BOEHRINGER, Mannheim
Carboxypeptidase	BOEHRINGER, Mannheim
Glukose-Oxidase-Testkit	BOEHRINGER, Mannheim
Glutathion-Reduktase	BOEHRINGER, Mannheim
Glutathion-Reduktase-Testkit	SIGMA, St. Louis
Helikase	MERCK, Darmstadt
Lactat-Dehydrogenase	BOEHRINGER, Mannheim
Pyruvat-Kinase	BOEHRINGER, Mannheim
L-(U)- ¹⁴ C-Glycin	NEW ENGLAND NUCLEAR, Boston
Zymolyase	SEIKAGAKU KOGYO CO., Tokio

2.4. Genetische Analyse:

Die genetische Analyse wurde nach Standardmethoden durchgeführt.

Kreuzungen:

Die Paarungspartner wurden durch kreuzweise Ausstriche auf YEPD-Platten gekreuzt. Zygotenbildung wurde nach 12 h Inkubation bei 30°C mikroskopisch untersucht. Um die Ausbeute an Zygoten in verschiedenen, schlecht paarenden *gsh*⁻ Kreuzungen zu erhöhen, wurden weitere Kreuzungsansätze versucht:

1. Aufeinanderzentrifugieren der Kreuzungspartner aus exponentiell wachsenden Kulturen (in flüssigen Vollmedium) mit unterschiedlicher Inkubationsdauer und -temperatur.
2. Kreuzstempel-Technik mit Zellen aus exponentiell wachsenden Kulturen.
3. Kreuzungen von Zellen aus Einzelkolonien in Medientröpfchen (50 µl) bei Raumtemperatur.

Durch stammabhängig variable Anwendung dieser verschiedenen Techniken gelang es in den meisten Fällen, die Hybridausbeute zu erhöhen.

Sporulation:

Zellmaterial wurde auf Präsporulationsmedium (PSM) über 12-15 h bei 30°C inkubiert, bevor es auf Sporulationsmedium (Acetatplatten) überimpft und bei gleicher Temperatur über 3-5 Tage inkubiert wurde.

Mikromanipulation:

Die sporulierten Diplonten (normale und aberrante Ascusbildung wurde mikroskopisch geprüft) wurden in 0,1 ml einer 1:20 Helicase-Lösung (Mischung aus β -Glucuronidase und Arylsulfatase) suspendiert und (stammabhängig) 20-60 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch 1:10-Verdünnung mit Puffer gestoppt. Die Mikromanipulation erfolgte mit einem Mikromanipulator (de Fonbrune Serie A) auf Agarplättchen. Die Sporen wurden in der Tetradenkonfiguration aufgereiht, die Plättchen anschließend auf YEPD-Platten gelegt und solange bebrütet, bis Kolonien deutlich sichtbar waren.

Massensporulation:

Die Zellen wurden mit längeren Inkubationszeiten als oben angegeben verdaut. Nach 1:50 Verdünnung der Suspension wurden die Asci mechanisch durch Ultrabeschallung in Eis (fraktioniert 2-5x jeweils 5sec; Intensität 4-6; Gerät der Fa. BRUNSWICK) aufgebrochen. Die Ausbeute an freien Sporen wurde mikroskopisch geprüft (mindestens 60%), bevor die Suspension nach geeigneter Verdünnung auf entsprechende Wachstamedien ausplattiert wurde.

2.5. Bestrahlungsbedingungen:

Die Bestrahlung erfolgte unter aeroben Bedingungen in einer ^{60}Co -Quelle mit einer Dosis-Leistung von 40 Gy/min. Die Bestrahlungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt an Zellen in Puffersuspension (0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0) mit anschließend sofortiger Ausplattierung auf YEPD, oder direkt auf Platten, wobei die Zellen unmittelbar vorher auf YEPD gebracht worden waren.

In der GSF, Frankfurt, wurden die Bestrahlungsexperimente ausschließlich in Puffersuspension mit 30 MeV Elektronen (Dosisrate: 130 Gy/min) bei 0°C durchgeführt.

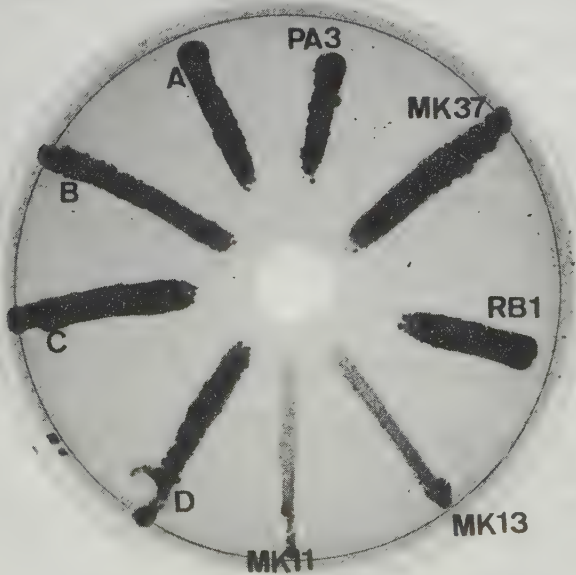
2.6. Plattendiffusionstest (Hemmhof-Schnelltest):

Isolation der gsh⁻ Stämme mittels Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG):

Aus einer Zellpopulation, die in Flüssig-Vollmedium (YEPD) bei 30°C bis zur stationären Phase angezüchtet wurde, wurden 2×10^7 Zellen auf YEPD-Platten mit 30 J/m^2 bestrahlt. Diese Dosis entspricht der LD_{37} (d.h. der Dosis, die 37% der Population überleben läßt), in deren Bereich laut Eckardt und Haynes (1980) ein maximaler Mutantenertrag zu erwarten ist. Danach wurde in jede Platte mit einem Korkbohrer ein Loch ausgestanzt (Durchmesser: 1 cm), in das unterschiedliche Konzentrationen MNNG (0.1-1.0 mg, gelöst in DMSO) als Selektionsmittel zugegeben wurden.

Die Platten wurden für 3 h in den Kühlschrank (4°C) gestellt, um eine vorzeitige MNNG-Degradation während des Diffusionsprozesses zu vermeiden, und danach bei 30°C über 5 Tage bebrütet. Durch die toxische Wirkung des MNNG entstehen Hemmhöfe. Größere Kolonien am Hemmhofrand wurden abgenommen und mehrfach in YEPD passagiert, bevor sie weiter charakterisiert wurden.

Der Hemmhof-Schnelltest diente in erster Linie der semiquantitativen Auswertung des intrazellulären GSH-Gehalts (mittels MNNG). Die Verlässlichkeit des Schnelltests zeigte sich darin, daß in keinem Fall eine in dieser Form festgestellte GSH-Defizienz durch die biochemische Bestimmung widerlegt wurde.



Figur 2.1 MNNG-Hemmhofschnelltest zur semiquantitativen Auswertung der GSH-Defizienz als Resistenzeigenschaft gegenüber MNNG (Konzentration: 680 nmol)
gsh⁻ Stämme: MK11, MK13, MK37, Sporen B und D (aus dem Diplonten der Kreuzung MK37 x PA3)
GSH⁺ Stämme: RB1, PA3, Sporen A und C (s. oben)

Zur semiquantitativen Substanzprüfung im Plattendiffusions-test wurden in YEPD-Platten in der Mitte mit einem Korkbohrer Löcher gestanzt (1 cm Durchmesser). Zellmaterial wurde in 0,05 M Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen (Suspensions-titer ca. 2×10^7 N/ml) und daraus mit einer Impfföse Ali-quots radial auf diese Platten ausgestrichen. Danach wurden die Substanzen in gelöster Form (0,1-0,2 ml) in diese Löcher eingetropft. Als Lösungsmittel dienten für MNNG, ENNG und ENU Dimethylsulfonat (DMSO), für CDNB und FDNB Ethanol (70%) und für alle anderen Substanzen steriles, bidestilliertes Wasser. Die Auswertung erfolgte durch Messung des Abstands zwischen Lochrand und dem Rand des Hemmhofs.

2.7. Mutationstestungen:

Durchführung:

Sofern im Text nicht ausdrücklich erwähnt, wurde folgendes Standardprotokoll benutzt:

In Flüssigmedium (YPD) angezogene Zellen wurden in definierten Wachstumsphasen geerntet, zweimal in Puffer (0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,0) gewaschen und im selben Puffer resuspendiert und auf einen Zelltiter von 2×10^8 N/ml (koloniebildende Einheiten) eingestellt. 2 ml dieser Suspension wurden in verschraubbaren 10 ml-Inkubationsröhrchen aus chemikalienresistentem Kunststoffmaterial (FALCON) mit der zu untersuchenden Chemikalie versetzt und zeitabhängig oder konzentrationsabhängig bei 30°C inkubiert. Die Inkubation wurde mit 8 ml eiskaltem Puffer gestoppt, die Suspension in der Kälte (0°C) abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 10 ml Phosphatpuffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in einem Gesamtvolumen von 2 ml resuspendiert.

Die Zellen wurden mit geeigneten Titern (ca. 200-400 koloniebildende Zellen pro Platte) auf SM, VM und GM zur Ermittlung der Überlebenden und der Induktion von Atmungsdefizienz ausplattiert. Zur Bestimmung der genetischen Ereignisse in den bereits beschriebenen Stämmen wurden die Zellen zur

Mutantenselektion auf synthetisches Medium ohne den entsprechenden Wuchsstoff, entsprechend den eingesetzten Markern, gebracht:

- SM ohne Tryptophan für die Erkennung der Reversion zur Tryptophan-Prototrophie in den Loci trp5-12 bzw. trp5-27 in haploiden Stämmen (2×10^7 N/Platte) oder für die Erkennung von Genkonversion in diploiden Stämmen (2×10^6 N/Platte)
- SM ohne Isoleucin/Valin entsprechend im Locus ilv1-92 als Mutationsmarker in Haplonten und Diplonten (2×10^7 N/Platte)
- SM ohne Adenin, wenn der Marker im Haplonten oder homozygot im Diplonten die absolute Adeninbedürftigkeit ade2-40 darstellte (2×10^7 N/Platte).

Die YEPD-Platten wurden 3 Tage, die synthetischen Medien 5 Tage (bei stark GSH-defizienten Stämmen sogar bis zu 14 Tagen) bei 30°C bebrütet.

Mathematische Auswertung:

Bezeichnet man mit N_0 die Zahl lebender, d.h. koloniebildender Einzelzellen pro Volumeneinheit der unbehandelten Suspension und mit $N_s(x)$ die Zahl der überlebenden Zellen, mit $N_m(x)$ die Zahl überlebender Mutanten bei der jeweiligen Mutagenosis x pro Volumeneinheit der homogen und einheitlich behandelten Suspension, dann ergibt sich der Anteil überlebender Zellen als $S(x) = N_s(x)/N_0$, die Mutantenhäufigkeit (Mutanten pro überlebende Zellen) als $M(x) = N_m(x)/N_s(x)$ und der Mutantenertrag (Mutanten pro behandelte Zellen, "yield") als $Y(x) = N_m(x)/N_0$. Der Mutantenertrag $Y(x)$ gibt dabei die gemeinsame Wahrscheinlichkeit an, daß eine Mutation fixiert wird [$M(x)$] und daß diese Mutante auch überlebt [$S_m(x)$]. Der Zusammenhang zwischen diesen drei Größen kann folgendermaßen formuliert werden:

$$Y(x) = M(x) \times S_m(x)$$

(ECKARDT und HAYNES, 1980; HAYNES und ECKARDT, 1980)

Die Werte $M(x)$ und $Y(x)$ wurden um die Spontanraten korrigiert.

2.8. Nachweis der Atmungskompetenz:

TTC-Overlay:

0,1 g Triphenyl-Tetrazoliumchlorid (TTC; sterilfiltriert) auf 100 ml Wasser, 1% Glukose und 1% Agar. Die stationären Plattenkulturen wurden mit 10 ml dieser Lösung (ca. 40°C) vorsichtig überschichtet und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Rot angefärbte Kolonien sind atmungskompetent.

DAPI-Anfärbung:

Eine für die Mikroskopie geeignet verdünnte Zellsuspension (ca. 2×10^7 N/ml) wurde in Puffer aufgenommen und mit 2 bis max. 5 μ l einer DAPI-Stammlösung (1 mg/ml Wasser) versetzt. Das Gemisch wurde über 30 bis 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (ZEISS 47 30 11-990, Neofluar 100 Objektiv) betrachtet.

Glyzerinmedium:

Wie YEPD, jedoch 3% Glyzerin (g/g) statt 2% Glukose.

2.9. Biochemische Bestimmungsmethoden

2.9.1. Thiol- (TSH und NPSH) und Glutathion-Bestimmung:

Zur Bestimmung von Thiol (Gesamt-Thiol = TSH; Nicht-Protein-Thiol = NPSH) und GSH wurden die Zellen bis zu den jeweils definierten Wachstumsphasen angezogen, in Puffer (den jeweiligen Versuchsbedingungen entsprechend zumeist in Phosphat- oder Trispuffer) zweimal gewaschen und in kleinen Volumina mit Suspensionstitern von mindestens 3×10^8 N/ml aufgenommen und mit einer vorgekühlten French Press-Zelle (AMINCO, 1380 bar) mechanisch (zweimal fraktioniert) aufgeschlossen.

Der Rohextrakt wurde in einem Ti 50,2-Rotor der Fa. BECKMAN bei 35.000 Upm (100.000xg) 50 min abzentrifugiert.

Aus dem Rohextrakt und dem cytosolischen (100.000xg) Überstand wurde der Gesamt-Thiol-Gehalt (Protein- und Nicht-Protein-Thiole) bestimmt. Für die GSH/GSSG- sowie NPSH-Bestimmungen wurde der 100.000xg Überstand einer PCA-Extrak-

tion (10% PCA Endkonzentration, 0,57 mM EDTA) unterworfen und anschließend durch HCO_3^- Zugabe (1,65 M K_2CO_3 , 1 M Triäthanolamin, 2 mM EDTA) auf pH 4,5-7,0 eingestellt. TSH wurde nach der Methode von ELLMAN (1959) und GSH im zyklischen Ellman-Test (TIETZE, 1969) als Summe des reduzierten (GSH) und oxidierten (GSSG) Anteils bestimmt. Das Testprinzip läßt sich in folgenden Gleichungen beschreiben:



(= Testprinzip nach ELLMAN)



(= Testprinzip nach TIETZE)

wobei:

DTNB = 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)

GR = Glutathion-Reduktase

TNB = 2-Thiophenyl-5-Nitrobenzoesäure (wird bei 405 nm gemessen)

Testansatz für TSH und NPSH:

(nach ELLMAN, 1959)

750, μl Puffer (0,1 M KH_2PO_4 , pH 8,0; 2 mM EDTA)

250, μl Probe (Rohextrakt oder 100.000xg)

25, μl DTNB (Stammlösung: 5 mg/ml DTNB, 1,5 mg

NaHCO_3 , 1 mM EDTA in 0,1 M

Phosphatpuffer)

1.025, μl

Der Ansatz wurde über 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 405 nm spektralphotometrisch gemessen (um den Leerwert korrigiert) und gegen eine Standardkurve mit GSH berechnet. Für die Bestimmung des NPSH-Anteils wurde der gleiche Testansatz gewählt, die eingesetzte Probe jedoch vorher deproteiniert.

Testansatz für GSH (Gesamt-GSH):

(nach TIETZE, 1969)

- 910,ul Puffer (0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,4; 2 mM EDTA)
- 50,ul NADPH (4,5 mg/ml in 2% HCO_3^- Lösung;
- 20,ul GR (1:11 verdünnt)
- 50,ul Probe/Standard (40,um GSSG = 80,um GSH)
- 10,ul DTNB (5 mg/ml Puffer, 1,5 mg NaHCO_3 , 1 mM EDTA)

1.040,ul

Die Kinetik der Reaktion wurde bei 405 nm spektralphotometrisch verfolgt. Um die Linearität der Reaktion zu gewährleisten, wurde im Überschuß von GR (1,26 mU im Inkubationsansatz) gearbeitet.

Testansatz für GSSG:

(nach SIES und SUMMER, 1975)

- 630,ul Puffer (siehe Gesamt-GSH-Bestimmung)
- 50,ul Probe
- 10,ul NADPH (0,9 mg/ml 2% HCO_3^- Lösung)
- 20,ul GR (1:11 verdünnt)

710,ul

Das Testprinzip beruht auf einer schnellen Bildungsreaktion von GSH aus dem oxidierten Anteil bei Zugabe der Glutathion-Reduktase:



Die Reaktion wurde spektralphotometrisch bei 340 nm als NADPH-Oxidation verfolgt.

2.9.2. GSH-S-Transferasen:

(nach HABIG et al., 1974)

Die CDNB-abhängige Aktivität der GSH-S-Transferasen wurde aus dem 100.000xg Überstand mechanisch (French Press) aufgeschlossener Zellen bestimmt. Dieser Test wurde parallel zu den GSH-Bestimmungen durchgeführt, so daß die Anzucht und Aufarbeitung der Zellen mit der für den GSH-Test identisch war.

Testansatz für die GSH-S-Transferasen-Bestimmung:

630,ul Puffer (0,1 M KH_2PO_4 , pH 6,5; 2 mM EDTA)

20,ul GSH (20,5 mg GSH/ml; 70 mM)

50,ul Probe (unverdünnt)

10,ul CDNB (7,05 mg/ml in Ethanol; 35,5 mM)

710,ul

Die Kinetik der Konjugationsreaktion wurde bei 340 nm spektralphotometrisch gemessen und um den Leerwert korrigiert. Der Extinktionskoeffizient (als differentieller Wert resultierend aus der Extinktionsabnahme von CDNB und der Extinktionszunahme des CDNB-Konjugats) betrug 9,6 (l/mmol·cm). Der pH-Wert des Puffers wurde auf pH 6,5 eingestellt, da mit steigendem pH die nicht-enzymatische Konjugationsreaktion stark zunimmt.

2.9.3. γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GTP):

(nach BERGMAYER, 1974)

Die Stämme wurden in flüssigen YEPD angezüchtet, in den jeweiligen Wuchsstadien ($1-3 \times 10^7$ N/ml bzw. $1-2 \times 10^8$ N/ml) geerntet, in Tris-Puffer, pH 9,0 gewaschen und mechanisch (French Press) aufgeschlossen. Die 100.000xg Überstände wurden für den photometrischen Ansatz eingesetzt.

Als γ -Glutamyl-donor wurde L- γ -Glutamyl-p-Nitroanilid (ORLOWSKI und MEISTER, 1963), als Akzeptor das Dipeptid Glycyl-Glycin verwendet. Bei den Testungen sollte bewußt auf den Einsatz Schwefel-tragender Akzeptorsubstanzen verzichtet werden, um mögliche pleiotrope Effekte für die in der GSH-Biosynthese geschädigten Enzyme der gsh⁻ Mutanten im γ -GTP-Test auszuschließen.

Der Test wurde in einer Küvette (1 cm Schichtdicke) direkt im Photometer (AMINCO, DW2, Double wavelength 405-500 nm) bei 30°C durchgeführt.

Testansatz für die γ -GTP-Bestimmung zur direkten photometrischen Bestimmung:

1.000, μ l	Gemisch aus je 1/3 Volumen L- γ -Glutamyl-p-Nitroanilid (2,63 mM), Glycyl-Glycin (52,5 mM) und MgCl (10,5 mM) in 0,1 M Tris-Puffer, pH 8,0
50, μ l	Probe (aus dem 100.000xg-Überstand)
1.050, μ l	

Die Berechnung der Aktivität erfolgte unter Zugrundelegung des Faktors, der von BERGMEYER (1974) für den Test unter diesen Bedingungen angegeben wurde.

Alternativ wurden in größeren Inkubationsansätzen (3 ml) nach bestimmten Zeiten Proben entnommen, mit 20% TCA gefällt (Stop der Reaktion), in einer Eppendorf-Microfuge abzentrifugiert, mit 1 M NaOH neutralisiert und die nach nochmaliger Zentrifugation gewonnenen Überstände spektralphotometrisch bei 405 nm bestimmt.

In beiden Inkubationsansätzen wurden lineare Kinetiken für die Bildungsgeschwindigkeit von p-Nitroanilin gefunden. Die Aktivität (mU/mg Protein) wurde auf den Proteingehalt (LOWRY et al., 1951) im 100.000xg Überstand bezogen.

2.9.4. Glutathion-Reduktase (GR):

(nach RACKER et al., 1955)

Die Aktivität der GR wurde aus dem Rohextrakt und dem 8.000xg Überstand von Zellen aus der spätlogarithmischen Wachstumsphase (ca. 1×10^8 N/ml) bestimmt und auf den Proteingehalt aus diesen Fraktionen bezogen.

Testansatz für GR:

800, μ l	Puffer (0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,6)
50, μ l	Rinderserumalbumin (1% im Test)
50, μ l	GSSG (66 mM; gelöst in H ₂ O)
50, μ l	NADPH (2 mM)
50, μ l	Probe bzw. GR-Standard
(spez. Aktiv.: 720 U/mg Prot.)	

1.000, μ l

Gemessen wurde die Kinetik der NADPH-Oxidation bei 340 nm im linearen Bereich und mit dem internen Standard verglichen. Der Leerwert wurde ohne Probe bzw. Standard gemessen und die gemessenen Werte entsprechend korrigiert.

2.9.5. γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (γ -GCS):

Der γ -GCS-Test in Saccharomyces cerevisiae wurde folgendermaßen durchgeführt:

400 ml einer spätlogarithmischen, in YEPD gewachsenen Kultur (2×10^7 N/ml) wurden zentrifugiert (bei größeren Ansätzen in Nalgene-Filtern gewonnen, Poren-Durchmesser $0,45 \mu\text{m}$), in Tris-Puffer (100 mM Tris, 2 mM EDTA, 10 mM MgCl_2 , 150 mM KCl), pH 8,0, gewaschen und in etwa 10 ml desselben Puffers aufgenommen. Die Zellen wurden nach Aufschluß bei $13.000 \times g$ 60 min zentrifugiert und 5 ml des Überstandes anschließend auf einer Sephadex G25-Säule ($2,6 \times 9,7$ cm) entsalzt.

Testansatz für die γ -GCS:

1.790 ml	Tris-Puffer (0,1 M; pH 8,5)
2.000 ml	Probe
0.050 ml	Na-Glutamat (800 mM)
0.050 ml	Na_2 -ATP (400 mM)
0.050 ml	Cys/DTE (800 mM/1,2 M)
0.050 ml	Phosphoenolpyruvat (160 mM)
0.008 ml	Pyruvat-Kinase (unverdünnt)

~4.000 ml

Die Reaktion wurde mit 35%iger Perchlorsäure (PCA) gestoppt, der Überstand nach Zentrifugation mit HCO_3^- /Triethanolamin neutralisiert und der Überstand bis zur Bestimmung bei -20°C aufbewahrt.

Die Bestimmung des Dipeptids erfolgte mit Hilfe eines Aminosäure-Analysators LC 6000 der Fa. BIOTRONIK.

Die Identifikation des Dipeptids im Aminosäure-Analysator erfolgte durch den Vergleich mit dem über Rattennieren-Enzym gewonnenen Dipeptid (mit Cystein als zweitem Substrat). Die Präparation und Aufreinigung der γ -GCS aus Rattennieren (Wistar-Ratten aus der Versuchstierhaltung der GSF) wurde nach der Methode von SEELIG und MEISTER (1984) durchgeführt: Die aus den Tieren präparierten Nieren wurden in dem 4fachen Volumen 0,1 M K-Phosphatpuffer (1 mM EDTA), pH 7,4, homogenisiert. Der 100.000xg-Überstand (50,2 Ti-Rotor, 35.000 Upm, 60 min) wurde mit Ammoniumsulfat gefällt (55% Sättigung) und 30 min gerührt. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 20 min) wurde der Überstand auf 70% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung gebracht und 30 min gerührt. Der Niederschlag aus der neuerlichen Zentrifugation wurde dann in Tris-Puffer (50 mM Tris, 5 mM Glutamat, 5 mM MgCl_2), pH 7,4, gelöst, und gegen den gleichen Puffer dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung auf eine DEAE-Cellulose Säule (2,5 x 11,5 cm) aufgetragen, mit 100 ml Puffer gewaschen, gefolgt von 100 ml Puffer (+ 0.12 M NaCl). Das Enzym wurde mit 100 ml Puffer höherer Ionenstärke (+ 0.2 M NaCl) von der Säule eluiert und anschließend in einer Ultrafiltrationszelle (YM 10 Membran) eingengt.

2.9.6. GSH-Synthetase:

(nach MOOZ und MEISTER, 1967)

Das Enzym akzeptiert anstelle von γ -Glu-Cys auch γ -Glu- γ -Aminobutyrat (γ -Glu- γ -AB). Diese Substanz ist vorteilhaft, da sie im Gegensatz zum natürlichen Substrat keine freie, leicht oxidable SH-Gruppe besitzt.

Die Präparation des Hefeextraktes erfolgte aus 300 ml einer in YEPD gewachsenen Kultur aus der logarithmischen Wachstumsphase ($2-5 \times 10^7$ N/ml). Die Zellen wurden nach Aufschluss 10 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einer Sephadex G25-Säule (10 x 1 cm) entsalzt, nachdem diese vorher mit 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,5 bei 4°C äquilibriert worden war.

Die nach Entsalzung gewonnene Proteinlösung wurde für den Enzymtest eingesetzt.

Testansatz für GSH-Synthetase:

100,ul Tris-HCl-Puffer, pH 8,5
 100,ul Mg^{2+} - K^+ -Lösung (1 M KCl; 0,1 M $MgCl_2$)
 50,ul Na-ATP (100 mM, pH 7,5)
 100,ul γ -Glutamyl-L-Aminobutyrat (50 mM; pH 7,0)
 50,ul Glycin (300 mM; pH 8,5)
 50,ul ^{14}C -Glycin (10 mCi/mmol)
 100,ul Serinborat (200 mM; pH 8,5)
 10,ul Pyruvat-Kinase (unverdünnt)
 100,ul Phosphoenolpyruvat (100 mM)
 100,ul Rinderserumalbumin (1%)
 40,ul H_2O
 200,ul Probe

1.000,ul

Die Inkubation bei 37°C wurde nach 0, 15, 30 und 45 min durch 2minütiges Erhitzen in kochendem Wasser gestoppt. Die deproteinierte Inkubationslösung wurde nach Zentrifugation bei 4.000xg auf eine Dowex Acetat (AG1x2) Säule (3 ml-Spritzentuben) aufgetragen. Das überschüssige ^{14}C -Glycin wurde mit 0,05 N Essigsäure eluiert. Das entstandene Tripeptid ^{14}C -Ophtalmsäure (γ -Glu-L-AB- ^{14}C -Gly) wurde mit 2 ml einer 3 N Essigsäure eluiert und in Szintillationsröhrchen mit 10 ml Volumen (Scintillationscocktail "D"; Stammlösung: 5 l Dioxan, 500 g Naphtalin, 25 g PPO und 3,3 l Triton X 100) in einem Beckman LS 100C-Scintillator gemessen. Kontrollwerte mit Substrat und Enzym alleine wurden von diesen Werten subtrahiert (beide Leerwerte entsprechen den Werten des vollständigen Ansatzes zum Zeitpunkt 0).

Die spezifische Aktivität der GSH-Synthetase wird hier definiert als die molare Menge gebildeter Ophtalmsäure/h·mg Protein. Die quantitative Trennung von ^{14}C -Glycin und ^{14}C -Ophtalmsäure in der Dowex-Acetat-Säule wurde mittels Dünnschichtchromatographie (TLC; MERCK-Kieselgelplatten mit

Butanol-Methanol-Acetonitril-Wasser in 35:20:20:25 als Laufmittel) nachgewiesen. Die Spuren wurden mit Ninhydrin sichtbar gemacht.

2.9.7. GSH-Vorstufenaufnahme:

Die Aufnahme von GSH-Vorstufen in die Zellen wurde durch die automatische Aminosäure-Analyse untersucht, mit deren Hilfe die Restkonzentrationen der supplementierten Substanzen im synthetischen Medium nach 6,5 h und 23 h bestimmt wurden. Die Ausgangskonzentrationen zu Beginn der Inkubation betrugen für Glutaminsäure (Glu) $68\text{ }\mu\text{M}$, für Glycin (Gly) $133\text{ }\mu\text{M}$ und für Cystin (Cys)₂ $20\text{ }\mu\text{M}$, das anstelle von Methionin als SH-tragende Aminosäure eingesetzt wurde.

Dabei wurden die Zellen in einer Vorkultur aus Flüssig-SM bis zu einem Zelltitert von 2×10^7 N/ml angezüchtet, geerntet, und im selben Volumen SM resuspendiert (mit den supplementierten Vorstufen) und weiter gezüchtet. Der Vorteil des hohen Anfangstiters liegt in der relativ geringen Biomasse-Zunahme über die gesamte Wachstumsphase von 23 h, während der jedoch GSH-abhängiger Stoffwechsel abläuft (THOMMEL, 1975).

Das Probenvolumen von jeweils 1 ml wurde in Eppendorf-Gefäßen abzentrifugiert und der Überstand bis zur Bestimmung im Aminosäure-Analysator bei -20°C eingefroren.

2.10. Trennverfahren in der Aminosäure-Analyse:

Die Identifizierung und Quantifizierung von Aminosäuren und Oligopeptiden erfolgte mit einem Aminosäure-Analysator LC 6000 der Fa. BIOTRONIK nach einem 1-Säulen-Trennverfahren ohne vorherige Hydrolyse der Probe. Die Proben wurden auf pH 2,0 eingestellt und unterschiedliche Volumina ($50\text{--}300\text{ }\mu\text{l}$) nach adäquaten Verdünnungen auf die Säule aufgetragen. Die Trennung erfolgte aufgrund der isoelektrischen Eigenschaften der Aminosäuren und Peptide durch kontinuierliche pH-Änderung des Laufpuffers. Der Nachweis wurde über die Ninhydrin-Reaktion geführt.

2.11. Proteinbestimmung:

(nach LOWRY et al., 1951)

20 μ l einer Probe wurden mit 100 μ l H_2O und 1 ml einer frisch angesetzten Lösung von 30 mg/ml Na_2CO_3 , 4 mg/ml NaOH, 0,4 μ g/ml K-Na-Tartrat, 0,2 μ g/ml $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ versetzt und für 15 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wurden 100 μ l des 1:3 verdünnten Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (MERCK) zugegeben und die Extinktion bei 650 nm nach weiteren 30 min Inkubation bei Zimmertemperatur bestimmt. Der Proteingehalt wurde aus einer Rinder Serumalbumin-(BSA)-Standarddeichkurve im Bereich von 0,65-2,7 mg/ml ermittelt.

2.12. Fermentation:

Für alle Fermentationen wurden Fermenter der Fa. BRAUN (Messungen) eingesetzt.

Bestückung der Fermenter:

Die Fermentationen erfolgten unter abgaskontrollierten Bedingungen (Parameter pCO_2 und pO_2 im Abgas, Ethanol kontinuierlich durch eine Ethanolsonde direkt im Arbeitsgefäß; "on line") in Zusammenarbeit mit Dr. BERTHE-CORTI, Universität Oldenburg, in Oldenburg.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

1. statische (batch-) Kulturen
2. Zufütterungs (fedbatch-) Kulturen

Sowohl für die statischen (batch-) als auch die Zufütterungskulturen wurden 10 l Reaktorgefäße mit 9 l Arbeitsvolumen gewählt.

Fermenterbestückung:

pH-, pO_2 , Temperatur- und Ethanol-Sonden zur Registrierung der in den Kulturen herrschenden Bedingungen (siehe Figur 2.2).

Fermentationsbedingungen für statische und fed-batch Kulturen

Vorkultur 1: 22 h bei 30°C im Rundschüttler bei 100 Upm (in YEED).

Vorkultur 2: 20 h (dito). Im Glyzerin-Versuch wurde Vorkultur 2 ebenfalls in 3% Glyzerin gezogen.

ungeregelte Kulturen:

Rührerdrehzahl: 400 Upm.

Begasung: aerob: 1 Normliter Luft/Liter Medium (= 1vvm Luft). Der O_2 -Partialdruck (pO_2) im Kulturgefäß schwankte zwischen 80-100%.

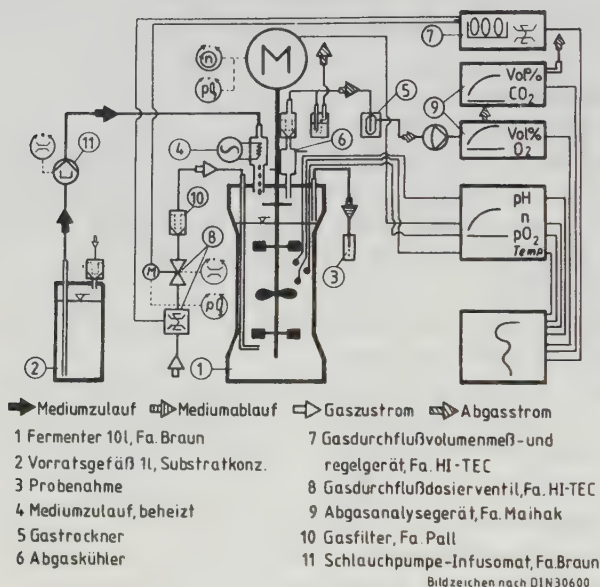
anaerob: 1 vvm (Stickstoff/techn. rein).

geregelte Kulturen:

- a) O_2 -Regelung: Über die Veränderung der Rührergeschwindigkeit und der Belüftungsrate.
- b) Regelung der Glukose-Konzentration: Hier wurde zu Beginn der Fermentation der gewünschte Glukosegehalt eingestellt und entsprechend dem (vorher berechneten) Verbrauch (bei Glukosereprimierung der Atmung) oder dem gewünschten Respirationskoeffizienten RQ (bei Glukoselimitierung) Glukose über eine Dosierpumpe ("Infusomat R"; Fa. BRAUN, Melsungen) zugegeben. Die zudosierte Menge wurde kontrolliert über die Gewichtsveränderung der Vorratsflasche. Die Glukosekonzentration im Medium wurde enzymatisch (Glukose-Oxidase-Test der Fa. BOEHRINGER, Mannheim) in regelmäßig entnommenen Proben bestimmt.

Die Atmungs- und Gärungsaktivität wurde kontinuierlich über den CO_2 - und O_2 -Gehalt im Abgas durch einen O_2 -(OXY-GOR 6N) bzw. CO_2 -(Unor 6N) Meßdetektor der Fa. MAIHAK (Hamburg) bestimmt. Die in regelmäßigen Abständen entnommenen Probevolumina enthielten mindestens 2×10^9 Zellen. Die Proben wurden 3x mit KH_2PO_4 -Puffer, pH 7,0 gewaschen und das Pellet bis zur Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Im Probenüberstand wurden pH-Wert (extern), Ethanol- (ADH-Testkit) und Glukosekonzentration bestimmt. Die on line-Bestimmung von Ethanol wurde in Ethanol-fedbatch-Kulturen gewählt.

Die Aufarbeitung der Proben (Bestimmung von GSH, GSSG, GSH-S-Transferasen) erfolgte spätestens 10 Tage nach Beendigung der Fermentation in der GSF.



Figur 2.2 Schematische Darstellung der Fermentationsanlage im batch-Betrieb (Biostat "S", Fa. BRAUN, Melsungen)

2.13. Verwendete Abkürzungen:

L-AB	L-Aminobutyrat
CDNB	1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol
DAPI	4,6-Diaminidino-2-Phenylindol
DTNB	5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure)
DTE	Dithioerytrol
FDNB	1-Fluor-2,4-Dinitrobenzol
ENU	N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff
ENNG	N-Ethyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
GM	Glyzerinmedium

GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion (reduziert und oxidiert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
γ -Glu- $\mathcal{L}$ -AB	γ -Glutamyl- $\mathcal{L}$ -Aminobutyrat
γ -Glu-Cys	γ -Glutamyl-Cystein
γ -GCS	γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase
γ -GTP	γ -Glutamyl Transpeptidase
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
NPSH	Nicht-Protein-Thiol
PSH	Protein-Thiol
SM	Synthetisches Vollmedium
TNB	2-Thiophenyl-5-Nitrobenzoesäure
TSH	Total-Sulphydryl
YEPD	Hefe-Vollmedium

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung und Charakterisierung von GSH-Defizienz Mutanten

Eine Möglichkeit, Zellen mit niedrigem GSH-Gehalt zu erhalten, stellt die Suche nach Mutanten dar, die einen Defekt in der GSH-Biosynthese haben.

Mit solchen Mutanten umgeht man die Schwierigkeiten, die bei Anwendung der vielfach oxidativ wirkenden chemischen GSH-Senker (Depletoren) mit ihren pleiotropen Stoffwechseleffekten (z.B. HARRIS, 1983; MEISTER, 1984; REED, 1986) und induktiven Effekten auf die GSH-Synthese (MEISTER, 1983) auftreten.

Für die Isolation von GSH-Defektmutanten sollten Stämme eingesetzt werden, die verschiedene genetische Ereignisse nachzuweisen erlauben. Vergleichende Genotoxizitätsuntersuchungen mit und ohne glutathiondefizienten Hintergrund sollten deshalb möglich sein.

3.1.1. Isolierung

Auswahl der Stämme

Es wurden die haploiden Stämme BK Rb1 und BK PA3 (freundlicherweise von Dr. B. KUNZ, Toronto, zur Verfügung gestellt) benutzt.

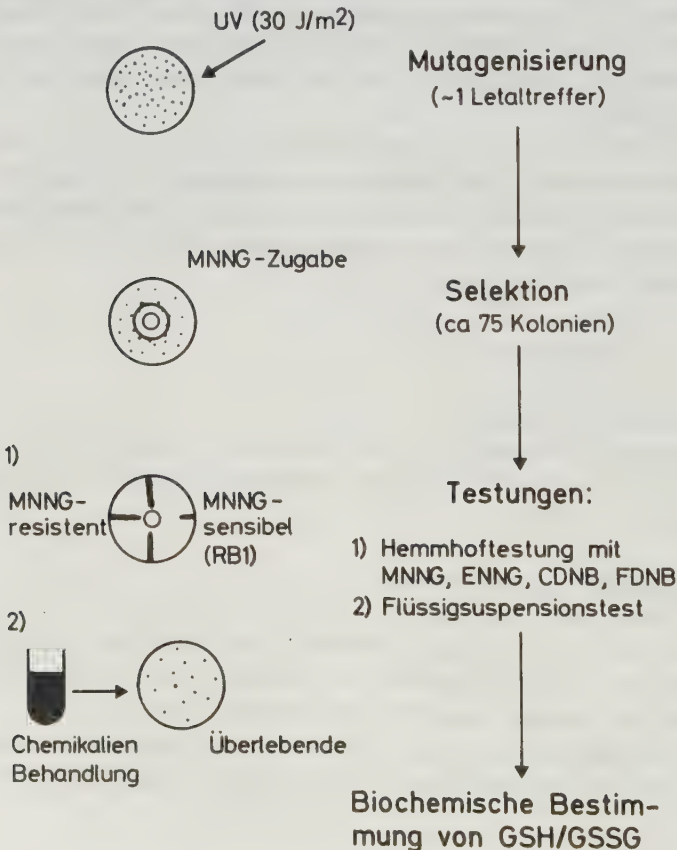
Selektion der gsh^- Stämme

Da MNNG über intrazelluläre Thiolgruppen, d.h. vor allem über GSH (ca. 50% des gesamten SH-Gehalts einer Zelle) metabolisiert wird (SÜSSMUTH und LINGENS, 1969), wobei die reaktive CH_3^+ Gruppe entsteht, sollten gsh^- Zellen von Saccharomyces cerevisiae eine geringere MNNG-Aktivierungskapazität aufweisen, und müßten deshalb MNNG-resistenter sein.

Zur klaren Unterscheidung der biochemischen Abkürzung GSH (für Glutathion) von der genetischen Nomenklatur wurde der Wildtyp mit GSH⁺ bezeichnet.

Diese Methode einer Selektion von gsh^- Zellen in einer GSH^+ Population ist einfacher als die Anwendung sensibilisierender Chemikalien, wie z.B. dem Diamid, mit dem es bisher nicht gelang, gsh^- Mutanten in Hefe (pers. Mitteilg. von M. PENNINCKX, Brüssel) zu isolieren.

Figur 3.1 zeigt die Isolationsprozedur, durch die von ursprünglich 75 MNNG-resistenten, d.h. möglicherweise GSH-defizienten Kolonien, sich schließlich nach biochemischer GSH-Bestimmung 5 Stämme als GSH-defizient erwiesen.



Figur 3.1 Flußdiagramm der Isolationsprozedur von GSH-Defektmutanten

Die vorläufige Benennung der gsh⁻ Stämme ergab sich aus der Reihenfolge, nach der sie selektioniert worden waren:

RB1/8 gsh⁻

RB1/37 gsh⁻

RB1/42 gsh⁻

PA3/11 gsh⁻

PA3/13 gsh⁻

Im folgenden werden die Abkürzungen "8", "37", "42", "11", "13" gebraucht.

3.1.2. Beschreibung phänotypischer Eigenschaften der gsh⁻ Ursprungs isolate

3.1.2.1. Glutathion-Gehalte

Die GSH-Gehalte in den beiden haploiden GSH-profizienten Ausgangsstämmen und den 5 GSH-defizienten Isolaten sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt. In allen Isolaten waren die Total-Thiolgehalte (TSH) als Folge der GSH-Senkung um ca. 25% (Stämme 8, 37 und 13), 32% (Stamm 11) und 43% (Stamm 42) reduziert, während die Protein-Thiolgehalte (PSH) mit Ausnahme des Stamms 42 mit dem des Wildtyps vergleichbar waren. Nur im Stamm 42 war auch der PSH-Gehalt um 13% reduziert. GSH macht den Hauptbestandteil des Nicht-Protein-Thiols (NPSH) aus. Erwartungsgemäß war das NPSH, das in normalen Hefezellen ca. 40-50% des TSH stellt, in den GSH-defizienten Stämmen in gleicher Weise gesenkt wie das GSH. Dies spricht dafür, daß in den Mutanten keine kompensatorische Anhäufung anderer NPSH (Cystein, Cystin, γ -Glu-Cys) auftritt.

STAMM	PROTEIN (mg/10 ⁹ N)	(nmol/10 ⁹ N)	GSH (nmol/mg Prot.)	(% WT) ¹⁾
RB1 GSH ⁺	4,5	300,0 [±] 26,0	66,7	100,0
PA3 GSH ⁺	4,8	233,0 [±] 5,0	48,5	100,0
8 gsh ⁻	4,9	14,5 [±] 4,0	3,0	4,8
37 gsh ⁻	4,7	18,0 [±] 1,8	3,8	6,0
42 gsh ⁻	6,4	10,4 [±] 1,1	1,6	3,5
11 gsh ⁻	4,2	5,2 [±] 5,6	1,2	2,2
13 gsh ⁻	3,0	4,9 [±] 3,2	1,6	2,1

Tabelle 3.1 GSH- und Protein-Gehalt der haploiden GSH⁺ und gsh⁻ Stämme.

GSH-Werte (Mittelwerte + Standardabweichung aus 3-5 unabhängigen Bestimmungen) als Summe der reduzierten und oxidierten Form (GSH + GSSG) wurden ermittelt nach der Methode von TIETZE (1969). Protein aus dem 100.000xg Überstand der mit French Press aufgeschlossenen Zellen aus der frühstationären Wachstumsphase wurde nach der LOWRY-Methode (LOWRY et al., 1951) ermittelt.

- 1) Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den jeweiligen Ausgangsstamm, von dem sie abgeleitet sind.

3.1.2.2. Wachstumscharakteristika

Um Aussagen über Wachstumscharakteristika zu bekommen, wurden die Zellen in flüssigen Vollmedium (YEPD) mit definierten Titern (1×10^6 N/ml) angeimpft und unter gleichen Bedingungen im Schüttelwasserbad inkubiert.

In nachstehender Tabelle 3.2 sind die Wachstumsparameter lag-Phase, Verdopplungszeit (t_d), stationäre Biomasse-Produktion und Trockengewicht (TG) zusammengefaßt.

STAMM	LAG-PHASE ¹⁾ (h)	t _d ²⁾ (h)	BIOMASSE ³⁾ (N/ml)	TG ⁴⁾ (mg/10 ⁹ N)
RB1	1-2	1,7	3,8x10 ⁸	14,5
PA3	1-2	1,6	3,6x10 ⁸	15,7
8	3.5-4	1,8	2,0x10 ⁸	13,0
37	2-3	1,8	1,4x10 ⁸	16,1
42	7-8	2,7	1,1x10 ⁸	17,0
11	6-8	4,0	1,6x10 ⁸	12,7
13	6-8	4,0	1,7x10 ⁸	7,3

Tabelle 3.2 Wachstumscharakteristika der GSH⁺ im Vergleich zu den gsh⁻ Stämmen

- 1) Die Dauer der lag-Phase ist eine Funktion des Alters der Zellen, die zur Animpfung verwendet wurden. Daher ist es nicht sinnvoll, die Werte zu mitteln. Durch eine Reihe von Experimenten mit Zellen unterschiedlichen Alters und Herkunft ergaben sich die angegebenen Grenzwerte.
- 2) Die Ermittlung der Verdopplungszeit (t_d) ergibt sich aus der untenstehenden Formel (FIECHTER, 1975; PIRT, 1975), die Generationszeit (GZ) wurde gleich der Verdopplungszeit (t_d) gesetzt

$$N = N_0 \cdot 2^{\frac{t}{t_d}}; \text{ daraus } t_d = \frac{t}{\log \frac{(N - N_0)}{2}} .$$

- 3) Die Biomasse wurde in stationären Kulturen bestimmt.
- 4) Trockengewichte wurden aus stationären Zellkulturen ermittelt durch Zentrifugation verschiedener Suspensionsvolumina in Eppendorf Röhrchen und anschließendem Trocknen der Pellets bei 37°C über 4 Tage.

Die GSH-Gehalte der 5 MNNG-resistenten Stämme liegen in einem für Eukaryonten bislang nicht erreichten niedrigen Bereich von ca. 2-6%. Dies führt zu Veränderungen der Wachstumseigenschaften der Stämme. Im Vergleich mit gsh⁻ Mutanten von Escherichia coli (APONTOWEIL und BERENDS, 1975a,b), zeigte sich auch in E. coli eine Verringerung der Gesamtbiomasse in drei von vier Isolaten, jedoch keine Beeinflussung der lag-Phase und des maximalen Wachstums im exponentiellen Kurvenabschnitt.

3.1.2.3. Einfluß des GSH (bzw. der GSH-Defizienz) auf die Zellatmung

Die vorwiegend in den gsh^- Mutanten 11, 13 und 42 beobachtete Eigenschaft, in Puffer (z.B. Kontrollen bei Mutagenitätstests in Suspension), nach bereits kurzer Lagerung (ca. 2-4 Wochen) auf Vollmedienplatten im Kühlschrank und nach Einfrieren und Wiederauftauen, spontan die Respirations-eigenschaft mit größerer Häufigkeit zu verlieren als GSH-Prototrophe, legt die Vermutung nahe, daß deren GSH-Defizienz direkt oder indirekt die mitochondriale Integrität beeinflusst.

Bei Einsatz von DAPI, einem fluoreszierenden Azo-Farbstoff, der spezifisch an AT-reiche Regionen bindet (WILLIAMSON und FENNELL, 1975), und damit eine Darstellung der mitochondrialen (mt) DNA ermöglicht, zeigte sich der überraschende Befund, daß in den respirationsdefekten gsh^- Mutanten und deren Abkömmlingen keine mt-DNA nachweisbar war (insgesamt 424 Sporen aus homozygoten gsh^- gsh^- und heterozygoten gsh^- GSH^+ Diploonten wurden auf Atmungskompetenz untersucht). Diese Mutanten mit komplettem Verlust der mt DNA wurden gemäß der Nomenklatur als ρ^0 Mutanten eingestuft. Es ist anzunehmen, daß die Atmungsdefizienz in den gsh^- Zellen eine Folge der GSH-Senkung ist. Aus Untersuchungen in Säugerzellen ist bekannt, daß mitochondriales GSH eine wichtige Rolle als Schutzfaktor gegenüber "oxidativen Stress" durch endogene und exogene Agentien spielt (GRIFFITH und MEISTER, 1981, 1985; HÜGBERG et al., 1980; MEREDITH und REED, 1982). Diese Agentien verursachen z.B. durch Zerstörung ungesättigter Fettsäuren Lipidperoxidation der mt Membranen (BABSON et al., 1981) .

3.1.2.4. Morphologische Merkmale und Knospungsverhalten

Glutathiondefiziente Stämme wuchsen auf festen YEPD-Medien zu Kolonien geringeren Durchmessers als deren Parentalstämme.

Hier war zu beobachten, daß Stämme mit GSH-Residualgehalten von 5% und weniger äußerst kleine Kolonien bildeten und wesentlich längere Inkubationszeiten benötigten. Die Stämme wurden mehrfach rückgekreuzt, um den Einfluß sekundärer Mutationen ausschließen zu können (siehe auch Punkt 3.2.1.1.).

Obwohl die gsh⁻ Mutation zu keinem temperaturkonditionalen Phänotyp führte, nahm die Inkubationstemperatur stärker Einfluß auf Koloniegröße, -form und Wachstumsdauer als in GSH⁺ Zellen.

Auch die Zahl der wahrscheinlich durch Letalsektorientierung bedingten "ausgefranst" ("nibbled") Kolonien erhöhte sich bei einer Temperatur von 37°C in den Stämmen 37, 42, 11 und 13 sowie deren Abkömmlingen, während Wildtyp-Stämme bei dieser Temperatur eine solche Morphologie noch nicht zeigten.

Im mikroskopischen Bild fanden sich einige Besonderheiten bei den Stämmen 42, 11 und 13: Knospende Zellen der drei oben genannten Stämme zeigten bei Wachstum in Flüssig-YEPD die Eigenschaft, ihre Knospen relativ früh als äußerst kleine Tochterzellen abzuwerfen. Jede Mutterzelle besaß nur eine Knospe, die erst desintegrierte, bevor ein neuer Knospungszyklus eingeleitet wurde. Auch Zygotenabnormitäten (Heterokaryonen) waren in diesen Stämmen zu beobachten (siehe auch 3.2.1.).

Aus den obigen Ausführungen kann auf die zumindest indirekte Beteiligung von GSH in Kernfusionsprozessen und Knospung in der Hefe Saccharomyces cerevisiae geschlossen werden. Solche Evidenzen existieren für Neurospora crassa, wo Veränderungen des gemischten GSH-Disulfid-Anteils während der Keimung und Alterung der Konidien gefunden wurden (FAHEY et al., 1975).

3.2. Genetische Charakterisierung der gsh⁻ Mutanten

3.2.1. Kreuzungsversuche und Tetradenanalysen

Kreuzungen wurden bei Stämmen, die sich problemlos paaren ließen, als Massenkreuzungen durch simples Ineinanderstreichen der Stämme durchgeführt (LINDEGREN und LINDEGREN, 1943). Die Diplontenselektion erfolgte in Verdünnungsausstrichen nach Größen- und Morphologiekriterien der Zellen. Die Stämme 11, 13, 42 und auch deren Filialstämme erwiesen sich in den meisten Kreuzungsversuchen schlecht hybridisierbar, so daß verschiedene andere Kreuzungsansätze durchgeführt wurden (siehe Material und Methoden).

Zygoten- und Diplontenisolierung

Da Kreuzungen vieler gsh⁻ Stämme nicht eindeutig zu identifizierende Zygoten und Diplonten hervorbrachten, wurden die vermeintlichen Zygoten und deren Hybridzellen durch Mikromanipulation isoliert, subkultiviert und über mikroskopisch geprüfte Einzelkolonien Diplonten isoliert. In wenigen Fällen war es möglich, über Auxotrophiemarker Diplonten in Verdünnungsausstrichen zu isolieren. Bei den Kreuzungspartnern 11, 13 und 42 bildeten sich in den homoallelischen, aber auch heteroallelischen Kreuzungen zwar typische Zygoten, jedoch war in der Zygotenpopulation ein apikales Ausknospen der Zygoten zu beobachten. Durch DAPI-Färbung und Wuchs auf Sporulationsmedium konnte gezeigt werden, daß in diesen Zygoten keine nukleare Fusion (Karyogamie) stattfand, so daß auch keine Hybridzellen entstanden.

Einige Befunde sprechen für einen ursächlichen Zusammenhang zwischen dem niedrigen GSH-Spiegel und der schlechten Zygotenbildung und Karyogamie:

1. Die Bildung einer großen Zahl kleiner, runder Zellen, deren lichtmikroskopische Brechung sich in der äußeren Begrenzung ganz charakteristisch von normalen Zellen unterscheidet, weist auf Sterilität hin (FOWELL, 1969).

Dazu neigen gsh⁻ Zellen offenbar.

2. Auch nachdem die gsh⁻ Stämme mehrfach mit einem unbehandelten Wildtypstamm (Elter) gekreuzt worden waren (zur Eliminierung evtl. entstandener Zweitmutationen) zeigten sie bei Kreuzungen in den Zygoten keine Kernverschmelzung (nukleare Fusion, Hybridbildung). Diese Situation war ausschließlich bei den stark GSH-depletierten Stämmen zu finden (11, 13 und 42gsh⁻). Die Färbung solcher Zellhybride mit DAPI zeigte erwartungsgemäß im Zeitverlauf von 12-36 h ca. 95% Zygoten mit Zwei-Kernpersistenz und kernenthaltenden apikalen Knospen.

3.2.1.1. Kreuzungen mit dem Wildtyp

Die gsh⁻ Stämme und ihre Abkömmlinge wurden gegen ihre Parentalstämme zurückgekreuzt. In diesen Kreuzungen läßt sich das phänotypische Verhalten einer Mutation im Diplonten studieren und die Frage nach der Expression der mutierten Eigenschaft beantworten:

Dominanz, Semi-Dominanz, Rezessivität

Die Segregationsanalyse sollte klären, ob der gsh⁻ Phänotyp monogenetisch vererbt ist (2:2 Segregationsmuster der gsh⁻:GSH⁺ Eigenschaft).

Außerdem dienten diese mehrfachen Rückkreuzungen dazu, weitere nicht näher charakterisierte Zweit- bzw. Mehrfachmutationen, die durch die Selektionsprozedur mit MNNG hätten induziert werden können, aus dem genetischen Hintergrund zu eliminieren.

Folgende Kreuzungen mit Ursprungsisolaten und deren Abkömmlingen¹⁾ wurden durchgeführt:

<u>gsh⁻ ♂</u>	x	<u>GSH⁺ ♀</u>	<u>GSH⁺ ♀</u>	x	<u>gsh⁻ ♂</u>
8	x	PA3	8 ¹⁾	x	RB1
37	x	PA3	37 ¹⁾	x	RB1
42	x	PA3	42 ¹⁾	x	RB1
11 ¹⁾	x	PA3	11	x	RB1
			13	x	RB1

Die Prozedur der Mikromanipulation zur Sporenisolierung ist in Material und Methoden (Punkt 2.4.) beschrieben.

GSH-Gehalte in heterozygoten GSH⁺ gsh⁻ Diplonten

KREUZUNG	GENOTYP	GSH/GSSG (nmol/10 ⁹ N)	GSH (%WT)
PA3 x RB1	GSH ⁺ GSH ⁺	377/ 30	100
8 x PA3	gsh ⁻ GSH ⁺	240/ 78	63
37 x PA3	gsh ⁻ GSH ⁺	281/ 38	75
42 x PA3	gsh ⁻ GSH ⁺	336/ - ¹⁾	89
11 x RB1	gsh ⁻ GSH ⁺	396/ 36	105
13 x RB1	gsh ⁻ GSH ⁺	300/ 43	80

Tabelle 3.4 GSH- und GSSG-Status in heterozygoten GSH⁺ gsh⁻ Diplonten im Vergleich zum Wildtyp GSH⁺ GSH⁺ (D7)

1) GSSG wurde nicht bestimmt.

Für jede Kreuzung wurden die GSH-Bestimmungen in jeweils einem repräsentativen Diplonten durchgeführt. Die weiteren 2-5 zur Verfügung stehenden Diplonten der gleichen Kreuzungen wurden nur im MNNG-Schnellhof-Test auf ihren GSH-Status hin bestimmt. Ein experimenteller Fehler von ca. 5% kann in Betracht gezogen werden für hohe und ca. 10% für geringe GSH-Gehalte.

Protein und GSH-Gehalte wurden wie üblich nach den Methoden von LOWRY (1951) respektive TETZE (1969) aus den 100.000xg Überständen frühstationärer (1-2x10⁸ N/ml) Zellpopulationen bestimmt.

GSSG wurde nach der Methode von SIES und SUMMER (1975) bestimmt und in GSH-Äquivalenten ausgedrückt. Dieser Wert wurde prozentual auf das Gesamt-GSH in den jeweiligen Diplonten bezogen.

Die GSH-Defizienz ist in allen fünf Allelen eine rezessive Eigenschaft, wie sich aus Messungen des GSH-Gehaltes (Tabelle 3.4) sowie durch Hemmhoftests zeigte.

Die in einigen Diplonten leicht verringerten intrazellulären GSH-Niveaus sind wohl eher auf leichte Unterschiede in den Wachstumskurven zurückzuführen, aus denen die Zellen geerntet wurden, als auf Gendosis-Effekte i.S. einer semi-dominanten Ausprägung der gsh⁻ Eigenschaft.

Die GSSG-Gehalte lagen in allen Stämmen auf vergleichbarem Niveau. So kann man von normalen Thiol-Disulfid Austauschreaktionen in allen Stämmen ausgehen und mögliche Gendosis-Effekte der gsh⁻ Eigenschaft in den heterozygoten Diplonten ausschließen.

Segregationsanalyse

Zur Segregationsanalyse wurden diploide Einzelkolonien isoliert, sporuliert und Tetradenanalysen durchgeführt. Die GSH-Eigenschaft wurde mit Ausnahme einiger Zweifelsfälle sowie einiger biochemischer Kontroll-Bestimmungen (mit Sporen aus der Kreuzung 8 x PA3) durch den Hemmhof-Test untersucht.

Der Übersichtlichkeit halber werden im weiteren alle Kreuzungsbezeichnungen in der Kurzform (z.B. 8 x 8 etc.) ausgedrückt; dies schließt auch die Kreuzungen mit Fl- oder F2-Abkömmlingen aus den Ursprungsisolaten ein.

Das Segregationsmuster der Sporen aus den vorliegenden heterozygoten Kreuzungen ist $2 \text{ gsh}^- : 2 \text{ GSH}^+$. In einer Vielzahl dieser Sporen wurden zusätzlich die Marker ade2-40 bzw. ade2-119, trp5-12 bzw. 5-27 und ilv1-92 untersucht sowie die Paarungstypen bestimmt. Auch diese Marker segregierten normal (2:2). Im Rahmen der Konstruktion von gsh⁻ Abkömmlingen des D7 konnte zusätzlich gezeigt werden, daß keines der gsh⁻ Allele mit den Markern ADE2 (Chromosomenabschnitt 15R), TRP5 (7L) und ILV1 (5R) gekoppelt vorliegt.

KREUZUNGEN	TETRADEN (komplett)	SPOREN (lebensfähig)	$\underline{gsh}^-:\underline{GSH}^+$	$\underline{gsh}^-:\underline{GSH}^+$ (Total)
8 x RB1	2	8	3:5	
8 x PA3	10	40	19:21	22:26
37 x RB1	8	32	17:15	
37 x PA3	29	116	58:58	75:73
42 x RB1	12	48	24:24	
42 x PA3	2	8	4:4	28:28
11 x RB1	10	22	6:16	
11 x PA3	6	20	9:11	
13 x RB1	11	43	21:22	21:22
13 x PA3		nicht durchgeführt		

Tabelle 3.5 Tetradenanalyse heterozygoter $\underline{GSH}^+$ $\underline{gsh}^-$ Diplonten

Aus der Kreuzung des Ursprungsisolats $\underline{llgsh}^-$ mit dem Wildtyp RB1 wuchs aus 10 Tetraden nur eine komplette 4er Tetrade hoch, aus den restlichen 9 gelegten Tetraden wuchsen nur jeweils 2 lebensfähige Sporen hoch. Aus der Kreuzung einer dieser lebensfähigen $\underline{gsh}^-$ Sporen der F1-Generation mit dem Wildtyp PA3 wuchsen wiederum nur eine 4er Tetrade, dagegen fünf 3er Gruppen hoch.

Diese hohe Letalität der Sporen aus Kreuzungen mit dem $\underline{llgsh}^-$ kann nicht erklärt werden, doch scheint das Sporenverhalten vom genetischen Hintergrund des Wildtyppartners abzuhängen, da im heterozygoten Diplonten und während der Sporulation ein GSH-Mangel als Ursache vermutlich nicht in Frage kommt. Systematischere Untersuchungen dieses Phänomens hätten jedoch zu weit vom Thema weggeführt und wurden deshalb nicht angestellt.

3.2.1.2. Komplementationsanalyse

Aus Kreuzungen der 5 $\underline{gsh}^-$ Stämme untereinander wurden Komplementationsdaten gewonnen, die Aussagen treffen sollten, ob die Mutationen verschiedene Gene des GSH-Metabolismus betreffen.

Komplementation (GSH^+ Phänotyp des Diplonten aus der Kreuzung $\text{gsh}_x^- \times \text{gsh}_y^-$) wird erwartet, wenn die Mutation in zwei unterschiedlichen Genen zu finden ist, Nicht-Komplementation dagegen macht eine Mutation im gleichen Gen ($\text{gsh}_x^- = \text{gsh}_y^-$) wahrscheinlich.

Neben den Ursprungsisolaten wurden F1- und F2-Sporen aus Rückkreuzungen mit dem Wildtyp eingesetzt.

Für die Komplementation wurde der GSH-Gehalt im Hemmhoftest mit MNNG und in einigen Fällen biochemisch bestimmt.

Nachfolgendes Schema zeigt die durchgeführten Kreuzungen:

KREUZUNG	8	37	42	11	13
8	+	+	+	+	+
37		+	+	+	+
42			+	-/Z	+
11				-/D	-/D
13					+

Tabelle 3.6 Komplementationsschema der Kreuzungen von gsh^- Haplonten

- + Kreuzungen bis einschließlich Sporenisolation und Sporencharakterisierung gelungen.
- Sporenanalyse nicht gelungen.
- Z Zygotenisolierung gelungen, jedoch keine Diplontenisolierung.
- D Diplontenisolierung gelungen, jedoch nicht die Sporulation. Die aus Zygoten isolierten präsumptiven Diplonten der Kreuzung 11x11 sporulierten zwar nicht, ließen sich jedoch auch nicht gegen Δ^- bzw. a-Referenzstämme paaren, was für den diploiden Status spricht.

GSH-Gehalte in heterozygoten $gsh_x^- gsh_y^-$ und homozygoten $gsh_x^- gsh_x^-$ Diplonten

KREUZUNG	GSH-GEHALT (nmol/10 ⁹ Zellen)	(% WT)
D7(WT)	377	100,0
8 x 11	21	5,6
8 x 13	37	9,8
37 x 11	62	16,4
37 x 13	41	10,8
8 x 8	34	9,0
37 x 37	11	2,9
42 x 42	3	0,8
13 x 13	20	5,3
11 x 11	10	2,7

Tabelle 3.7 GSH-Gehalte in heteroallelischen $gsh_x^- gsh_y^-$ und homoallelischen $gsh_x^- gsh_x^-$ Diplonten im Vergleich zum homoallelischen $GSH^+ GSH^+$ Diplonten D7

Die heteroallelischen Diplonten der Tabelle 3.7 zeigten erheblich reduzierte GSH-Gehalte, was auf eine Nicht-Komplementation hinweist ($gsh_x^- = gsh_y^-$). Die GSH-Gehalte dieser Diplonten waren jedoch durchweg höher als die der homoallelischen Diplonten, was auf eine moderate Kompensation (intragenische Komplementation oder unspezifische Hintergrundeffekte?) hindeutet.

Segregationsanalyse der heteroallelischen $gsh_x^- gsh_y^-$ und homozygoten $gsh_x^- gsh_x^-$ Diplonten

Da die biochemische GSH-Bestimmung der heteroallelischen Diplonten auf eine Nicht-Komplementation hinwies, war zu erwarten, daß die Segregationsanalyse ausschließlich gsh^- Sporen liefern würde. Die Segregationsanalyse (Tabelle 3.8) bestätigte die Vermutung, daß die 5 Allele in einem Gen zugehörig sind. Auch die homoallelischen Diplonten zeigten ausnahmslos eine 0 GSH^+ : 4 gsh^- Segregation.

KREUZUNG	TETRADEN (komplett)	SPOREN (lebensfähig)	gsh^- : GSH^+
8 x 37	14	56	56 : 0
8 x 42	4	11	11 : 0
8 x 11	10	35	35 : 0
8 x 13	22	73	73 : 0
37 x 42	23	92	92 : 0
37 x 11	5	12	12 : 0
37 x 13	31	123	122 : 1
42 x 11	nicht durchführbar ¹⁾		
42 x 13 ¹⁾	4	15	15 : 0
11 x 13	nicht durchführbar ¹⁾		
8 x 8	8	32	32 : 0
37 x 37	30	120	120 : 0
42 x 42	4	16	16 : 0
13 x 13	15	36	36 : 0
11 x 11	nicht durchführbar ²⁾		

Tabelle 3.8 Segregation der heteroallelischen gsh^- gsh^+ und homoallelischen gsh_x^- gsh_x^+ Diplonten

- 1) Die Sporulation der Diplonten aus den Kreuzungen 11 x 13 sowie 42 x 11 gelang trotz intensivster Bemühungen (durch Einsatz von insgesamt ca. 20 verschiedenen Kreuzungsansätzen mit unterschiedlichen Abkömmlingen der Ursprungsisolate) nicht.
- 2) Weder das Ursprungsisolat noch zwei aus heterozygoten Kreuzungen gewonnene Abkömmlinge konnten als ρ^+ Zellen stabil gehalten werden. Sporulation benötigt O_2 . Diploide ρ^- Zellen können nicht sporulieren (Puglisi und Zennaro, 1971; Tsuboi et al., 1974; Marmiroli et al., 1981).

Die gegenüber dem Erwartungswert (4xZahl der Tetraden) beobachtete geringere Gesamtzahl lebensfähiger Sporen resultierte aus der teilweisen aberranten Sporenzusammensetzung 3 : 1 (lebensfähig : letal), so daß auf eine tabellarische Aufschlüsselung verzichtet wurde.

Das Mißlingen der Sporulation aus den Kreuzungen 42 x 11 und 11 x 13 wird auf den geringen GSH-Gehalt in beiden Ausgangsstämmen und dessen pleiotropen Wirkung auf die Sporulation zurückgeführt, jedoch kann aus den vorliegenden Resultaten bereits eindeutig belegt werden, daß es sich in allen Isolaten um Allele eines Gens handelt.

Trotz der im allgemeinen sehr niedrigen Paarungsbereitschaft vieler Kreuzungspartner und vieler anderer bereits beschriebener Probleme bei Kreuzungen mit gsh⁻ Stämmen, kann eine Selbstdiploidisierung von gsh⁻ Haplonten, die als alternative Erklärung für dieses Ergebnis dienen könnten, ausgeschlossen werden: Da die gsh⁻ Haplonten aufgrund ihres unterschiedlichen GSH-Gehalts meßbar unterschiedliche Hemmhöfe aufwiesen, fanden sich diese Unterschiede auch in der Aufspaltung der Sporen aus den heteroallelischen gsh_x gsh_y Diplonten.

Da alle Stämme nunmehr einer Komplementationsgruppe zugeordnet werden können, scheint es sinnvoll, den Allelen eine endgültige Nomenklatur zu geben. Sie soll im Rahmen dieser Arbeit im weiteren verwendet werden:

Haplonten:

Stammbezeichnung	Genbezeichnung
MK8 <u>gsh</u> ⁻ für den Stamm 8	<u>gsh1-1</u>
MK37 <u>gsh</u> ⁻ " " 37	<u>gsh1-2</u>
MK42 <u>gsh</u> ⁻ " " 42	<u>gsh1-3</u>
MK11 <u>gsh</u> ⁻ " " 11	<u>gsh1-4</u>
MK13 <u>gsh</u> ⁻ " " 13	<u>gsh1-5</u>

Eine wichtige Beobachtung, die im Rahmen der beschriebenen Kreuzungsexperimente gemacht werden konnte, ist hier festzuhalten: homoallelische gsh⁻ gsh⁻ Diplonten weisen zwar einen stabil niedrigen GSH-Gehalt auf (Tabelle 3.8), zeigen jedoch im Gegensatz zu gsh⁻ Haplonten keine sichtbaren Beeinträchtigungen in ihren Wachstumscharakteristika im Vergleich zu dem Wildtyp D7:

es treten keine (für gsh⁻ Haplonten typische) Verzögerungen in den lag-Phasen auf, vergleichbare Verdopplungszeiten und nur eine geringfügige Reduktion in der Biomasse-Produktion, respektive der Koloniegrößen bei Wuchs auf festen Medien.

Diese moderate Wirkung der GSH-Defizienz in Diplonten ist gegenwärtig nicht zu erklären. Es wird als unwahrscheinlich angesehen, daß weitere Mutationen vorhanden waren, die in Haplonten in synergistischer Weise mit der gsh⁻ Mutation in Wechselwirkung treten, in Diplonten jedoch komplementieren: die gsh⁻ Stämme wurden in einzelnen Fällen bis zu fünfmal mit GSH⁺ Stämmen rückgekreuzt. Eine enge Kopplung einer weiteren Mutation mit der gsh⁻ Eigenschaft sollte aufgrund der großen Zahl analysierter Sporen (ca. 420) ebenso unwahrscheinlich sein, zumal in keinem der heteroallelischen gsh_x⁻ gsh_y⁻ Diplonten eine Reversion zur GSH-Prototrophie zu beobachten war (Tabelle 3.7).

3.3. Biochemische Charakterisierung der gsh⁻ Mutanten

Aus den Komplementationsdaten der genetischen Analyse war eindeutig zu schließen, daß alle fünf gsh⁻ Isolate im gleichen Gen defekt sind. Obwohl aufgrund der starken GSH-Depletion ein Defekt in der GSH-Synthese zu vermuten war, war die biochemische Charakterisierung des Enzymdefekts notwendig. Die Entscheidung, statt eines repräsentativen gsh⁻ Stammes alle fünf Isolate in diese Arbeiten miteinzubeziehen, hatte verschiedene Gründe.

Es sollte zwar in erster Linie der für die GSH-Defizienz verantwortliche Enzymdefekt identifiziert werden, aber es war nicht auszuschließen, daß verschiedene Mutationen in unterschiedlichem Maße den gesamten γ -Glutamylzyklus beeinflussen könnten (Rückkopplungen auf den γ -Glutamylzyklus durch chemische Depletion sind beschrieben; z.B. GRIFFITH und MEISTER, 1979; MEISTER, 1984; REED, 1986).

3.3.1. Oxido-Reduktions-Status und Glutathion Reduktase

In Hefen liegt das GSH:GSSG Verhältnis aufgrund der Glutathion-Reduktase-(GR-) Aktivität weit auf der Seite der reduzierten Form (siehe Tabelle 3.5; THOMMEL, 1975).

Bereits geringe Erhöhungen des GSSG-Anteils führen zur wachstumsregulierenden Hemmung der Proteinbiosynthese durch Veränderung der Wechselwirkung zwischen GSSG und Proteinthiolgruppen (KOSOWER und KOSOWER, 1969). Dies zeigt, daß Wachstumsveränderungen und andere Stoffwechselphänomene nicht immer durch erniedrigte GSH-Gehalte ursächlich bedingt sind, sondern durch erhöhte GSSG-Konzentrationen zustandekommen können (KROHNE-EHRICH und UNTUCHT-GRAU, 1977). Im übrigen ist GSSG in höheren Konzentrationen toxisch und muß aus den Zellen transportiert werden (BEUTLER, 1983).

Durch die starke Verringerung des GSH + GSSG in den gsh⁻ Haplonten war die anteilmäßige Bestimmung des intrazellulären GSSG praktisch unmöglich. Die geringen GSH-Gehalte ließen jedoch vermuten, daß die Aktivität der GR in den Mutanten nicht in der Weise beeinträchtigt sein konnte, daß sie eine derart massive GSH-Depletion erklären würde.

Die quantitative Bestimmung zeigte allerdings bei allen Stämmen mit Ausnahme des MK37 im Vergleich zum Wildtyp eine Verringerung der GR-Aktivität (Tabelle 3.9).

Da eine vermehrte Permeation von GSH oder GSSG aus den GSH-depletierten Zellen in das Medium als weitere Ursache der GSH-Defizienz allerdings nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde der extrazelluläre GSH/GSSG-Gehalt im Medium (als Filtrat einer stationären Zellsuspension) bestimmt. Es konnte keine GSH/GSSG-Akkumulation im Medium beobachtet werden.

STAMM	GR (nmol/min·mg Protein)	% WT
RB1	61	100
MK8	25	41
MK37	64	105
MK42	17	28
MK11	39	64
MK13	20	33

Tabelle 3.9 Glutathion-Reduktase-(GR-) Aktivitäten in GSH⁺ und gsh⁻ Zellen

Die GR-Aktivitäten und Protein wurden im 8.000xg Überstand spätlogarithmischer Flüssigkulturen nach French-Press-Aufschluß bestimmt. Die Daten stammten aus einem Versuch, bei dem alle Stämme unter identischen Voranzucht- und Versuchsbedingungen parallel untersucht wurden. Aus Vorversuchen mit einzelnen Stämmen ließ sich ein Fehler von maximal 10% abschätzen.

3.3.2. Aufnahmekinetiken und Zufütterung von GSH-Vorstufen

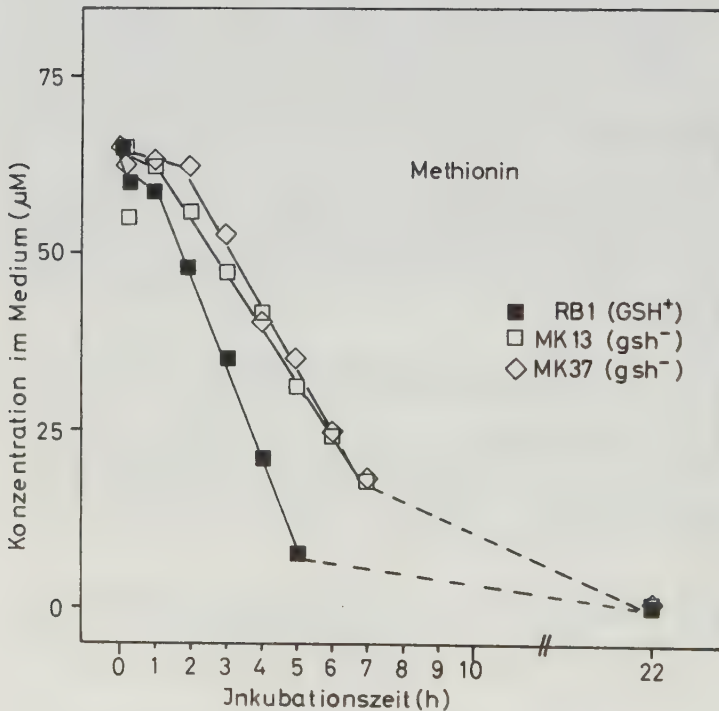
Es wurden Untersuchungen über mögliche Defekte in der GSH-Vorstufensynthese und/oder Permeabilitätsprobleme als denkbare Ursache der GSH-Defizienz angestellt, wobei zwei Fragen beantwortet werden sollten:

1. Läßt sich durch Zufütterung von GSH-Vorstufen die GSH-Defizienz beheben, d.h. liegt der Defekt in der Mutation eines Gens, das die Vorläufer-Synthese kontrolliert?
2. Könnte die GSH-Defizienz auf einen Defekt in der Aufnahme (Permeation) von Aminosäuren in die Zellen zurückgeführt werden?

In einem solchen Fall sollte die Aufnahme einer oder evt. mehrerer der GSH-Vorstufen (Cystein, Methionin, Glutaminsäure, Glycin) gestört sein.

3.3.2.1. Aufnahmekinetik-Studien:

Die Aufnahme der für die GSH-Synthese wichtigen, da schwefelhaltigen Aminosäure Methionin, wurde stellvertretend für das im wesentlichen gleichartige Aufnahmeverhalten der anderen angebotenen Aminosäuren in gsh⁻ und GSH⁺ Stämmen dargestellt (Figur 3.2).



Figur 3.2 Zelluläre Aufnahme von Methionin in GSH⁺ und gsh⁻ Stämmen

Die zelluläre Aufnahme wurde im Aminosäure-Analysator bestimmt und ist hier dargestellt als Konzentrationsabnahme im Medium (SM).

Der über 7 h beobachtete Zellzuwachs in diesem Versuchsan-satz war vernachlässigbar gering (Faktor 2 beim Wildtypstamm RB1 und Faktor 1.2 bei den beiden gsh⁻ Stämmen), da die Zellen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase (in SM bereits bei 2×10^7 N/ml) in das gleiche Volumen frischen SM's überführt wurden.

Das Permeationsverhalten der im Synthetischen Medium (SM) angebotenen Aminosäuren (gemessen als Abnahme im Medium und bestimmt im Aminosäureanalysator) zeigte in gsh⁻ Mutanten und Wildtypstamm mit kleinen, doch nicht signifikanten Abweichungen vergleichbare Kinetiken für alle angebotenen Aminosäuren (Arg, Lys, Trp, Ile, Leu, Val, His und Met, welche als schwefelhaltige Vorstufe für Cystein und damit GSH dient).

3.3.2.2. Zufütterungsversuche

Es wurden die gsh⁻ Mutanten mit verschiedenen GSH-Vorstufen und Derivaten zugefüttert¹⁾:

- a) Cystein (Cys) (100, μ M)
- b) Cystin (Cys)₂ (100, μ M)
- c) N-Acetylcystein (NAC) (100, μ M)
- d) Glutaminsäure (Glu) (100, μ M)
- e) Glycin (Gly) (100, μ M)
- f) Glutathion (GSH) (100, μ M)

Die Zufütterungen mit den oben genannten GSH-Vorstufen und GSH wurden in flüssigen bzw. festen YEPD- und SM-Medien durchgeführt. Die angebotenen Mengen lagen im Konzentrationsbereich der im SM angebotenen Aminosäuren, um eine Rückkopplungshemmung auf die Permeation der Vorstufen oder eine toxische Wirkung von Cystein zu vermeiden. Die einzelnen Komponenten wurden alleine oder im Gemisch angeboten. Die stationär gewachsenen Zellen wurden in üblicher Weise geerntet, aufgeschlossen und der GSH-Bestimmung zugeführt.

1) Cystein ist unter aeroben Bedingungen eine leicht zu oxidierende Aminosäure, im Aminosäure-Analysator ohne Derivatisierung nicht nachweisbar und außerdem schlechter permeabel als Cystin ([Cys]₂), welches von Hefe gut aufgenommen und intrazellulär zu 2 Cysteinresten gespalten wird. (Cys)₂ ist wie Glutamat ein gutes Substrat für die γ -Glutamyl-Transpeptidase. Das acetylsubstituierte Cysteinderivat N-Acetylcystein (NAC) ist durch die Acetylierung gegen oxidative Reaktionen geschützt.

Das Wildtyp GSH-Niveau in den gsh⁻ Zellen war in keinem Fall rekonstituiert und lag innerhalb des Fehlerbereichs der GSH-Bestimmung (ca. 10% bei niedrigen Werten).

Parallel dazu wurden die supplementierten Zellen im MNNG-Hemmhof-Test untersucht. Auch im Hemmhof-Test zeigten alle supplementierten gsh⁻ Stämme Inhibitionszonen, die mit denen der unbehandelten übereinstimmten.

Quantitative Untersuchungen über die Aufnahme der drei GSH-Vorstufen bestätigten, daß deren Aufnahmefähigkeit bei allen Stämmen vergleichbar ist (Tabelle 3.10).

STAMM	ZELLULÄRE AUFNAHME (%) DER VORSTUFEN					
	GLUTAMAT		GLYCIN		CYSTIN	
	6,5 h	23 h	6,5 h	23 h	6,5 h	23 h
RB1	0	76	13	97	0	100
MK 8	0	100	7	78	0	100
MK37	21	81	32	72	10	100
MK42	0	89	11	68	0	100
MK11	19	78	3	68	9	100
MK13 (SUP)	67	94	91	100	62	100

Tabelle 3.10 GSH-Vorstufen-Aufnahme (in % der zugegebenen Menge) in GSH⁺ und gsh⁻ Zellen nach 6,5 h und 23 h Inkubation in Synthetischen Medium, berechnet aus der Abnahme der Ausgangskonzentration im Medium

Da durch die Wahl des Mediums (SM) und des Animpftiters (2×10^7 N/ml) Nichtwuchsbedingungen herrschten, konnte unter Inkubation eines kleinen Fehlers auf eine Korrektur der Werte um die Zellzunahme verzichtet werden. Die Vorstufen-Aufnahme wurde durch die Bestimmung der verbleibenden Restkonzentrationen der zugefütterten Substanzen im SM im Aminosäure-Analysator ermittelt. Die Ausgangskonzentrationen zu Beginn der Inkubation betrugen für Glu 68/ μ M, Gly 133/ μ M und Cys₂ 20/ μ M. MK13 (SUP) ist ein im gsh⁻ Status supprimierter Stamm (MK13-2D; siehe auch Punkt 3.3.7.).

Die Befunde machen wahrscheinlich, daß die gsh⁻ Mutation weder zu einem Defekt der Synthese der GSH-Vorstufen noch zu einer Veränderung im γ -Glutamylzyklus geführt hat, sondern zu einer Blockierung der GSH-Biosynthese.

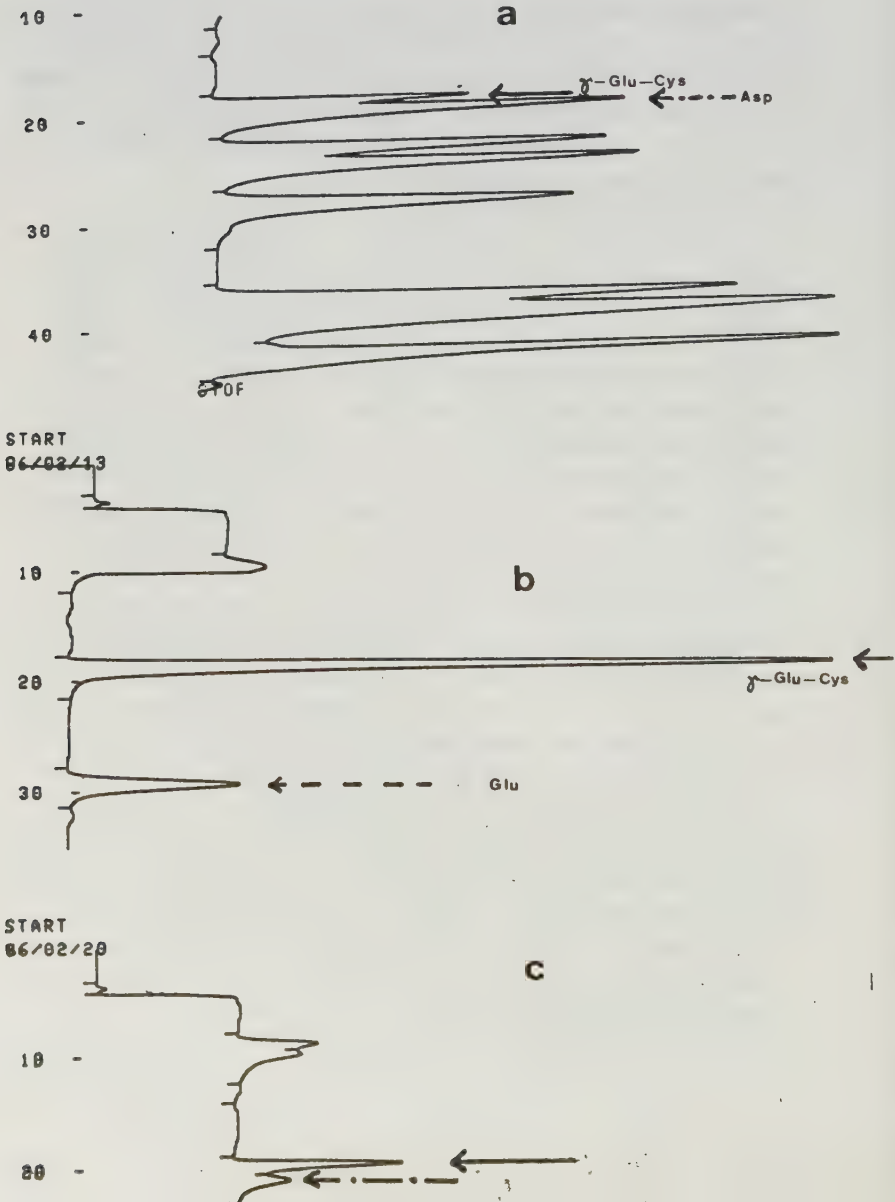
Deshalb wurde der biochemischen Untersuchung der GSH-synthetisierenden Enzyme Priorität eingeräumt.

3.3.3. γ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase (γ -GCS)

Die Anwendung des für Säugerzellen entwickelten gekoppelten NADH-Tests (SEELIG und MEISTER, 1984) war nicht möglich. Auch Versuche, das Dipeptid γ -Glu-Cys mittels HPLC-Techniken nachzuweisen, schlugen fehl. Erfolgreich war schließlich der Nachweis des Dipeptids im Aminosäure-Analysator, wenn folgende Bedingungen eingehalten wurden:

1. Nach dem Zellaufschluß wurde der Rohextrakt schnell und in der Kälte (4°C) aufgearbeitet, um die Aktivität von ATPasen und Proteasen zu verringern. Protease-Aktivität führte zu einer starken Erhöhung von Degradationsprodukten in Form oligomerer Peptide und Aminosäuren, wodurch der Gipfel von γ -Glu-~~L~~-Aminobutyrat (γ -Glu-~~L~~-AB) durch Überlagerungen mit weiteren Gipfeln (Aspartat) nicht eindeutig zuzuordnen war. Die schnelle Abtrennung (Entsalzung) kleinmolekularer Substanzen vom Enzymextrakt wurde durch Gelfiltration in einer geeichten Sephadex-Säule G25 erreicht, wobei störende Protease- (z.B. KATSUNUMA et al., 1972) bzw. ATPase-Aktivitäten in Grenzen gehalten und deshalb auf den Einsatz von ATPase-Inhibitoren (z.B. Oligomycin und Aurovertin) verzichtet werden konnte.
2. Das zu erwartende Dipeptid γ -Glu-~~L~~-AB zeigte nahezu die gleiche Retentionszeit wie das Degradationsprodukt Aspartat, so daß eine Quantifizierung des Dipeptids nicht möglich war. Ersatz von ~~L~~-Aminobutyrat (~~L~~-AB) durch Cystein (auf das in der Regel wegen dessen starker Oxidierbarkeit verzichtet wird), stabilisiert durch äquimolare Konzentrationen von DTE (Dithioerythriol; LELAND, 1964), führte zum Dipeptid γ -Glu-Cys (dem natürlichen Produkt des ersten enzymatischen Schrittes der GSH-Biosynthese), welches sich in der Aminosäureanalyse eindeutig zuordnen und quantitativ bestimmen ließ.

Die Identifikation des Dipeptids erfolgte mit Hilfe eines aus Rattennierenenzym gewonnenen Referenz-Dipeptids γ -Glu-Cys nach der Methode von SEELIG und MEISTER (1984) (siehe Material und Methoden).



86/02/20

10 -

20 -

30 -

d

← γ -Glu-Cys

Asp

START

86/02/25

10 -

20 -

30 -

e

← γ -Glu-Cys

START

86/02/20

10 -

20 -

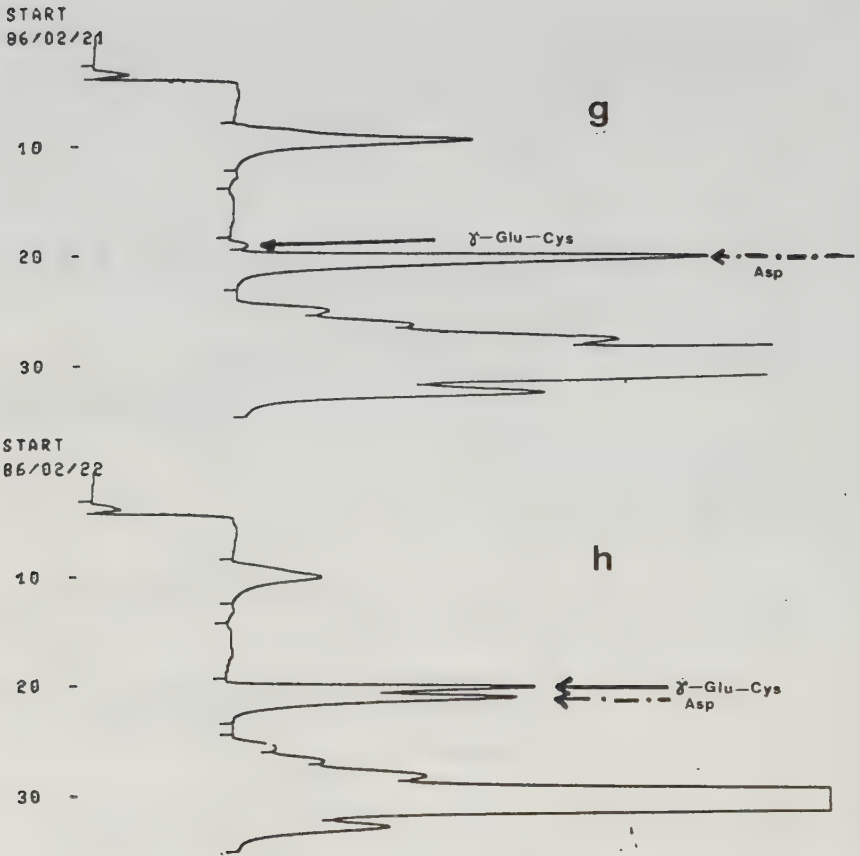
30 -

f

← γ -Glu-Cys

Asp

3.502



Figur 3.3a-h Retentionsprofile des Dipeptids γ -Glutamyl-Cystein (γ -Glu-Cys) von GSH^+ und gsh^- Stämmen im Aminosäureanalysator

- a) Probengemisch verschiedener Aminosäuren und γ -Glu-Cys aus Rattennieren
- b) γ -Glu-Cys und Glu aus Rattennieren-Ansatz
- c) RB1 (30 min Inkubation)
- d) RB1 (" " + Referenz aus Nierenansatz)
- e) RB1 (" " + ATP-regenerierendes System)
- f) RB1 (Kontrolle)
- g) MK8 (30 min Inkubation)
- h) MK8 (" " + Referenz)

← Dipeptid-Gipfel (γ -Glu-Cys)
 ← Aspartat-Gipfel (Asp)

Die Abbildungen demonstrieren die gebildeten Dipeptidgipfel (durch Pfeile gekennzeichnet) nach 30 min Inkubationsdauer in Glu/Cys-haltigen Ansatz. Die Retentionszeiten des Dipeptids in den verschiedenen Ansätzen unterschieden sich zwar minimal (abhängig von der aufgetragenen Menge sowie des pH-Wertes), jedoch der relative Abstand zum nächstgelegenen Gipfel (Aspartat) in allen Ansätzen war vergleichbar und groß genug, um die Flächenintegrale zu ermitteln. Bei Zugabe des aus Nierenenzym gewonnenen Dipeptids konnte eine exakte Zuordnung der Retentionsgipfel getroffen und unzweifelhaft die in den Mutanten kaum in Erscheinung tretenden Dipeptidgipfel identifiziert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, daß nach Zugabe eines ATP-regenerierenden Systems (PEP/PK) die Dipeptidbildung erwartungsgemäß erhöht ist (Fig. 3.3e), da der γ -GCS-Schritt unter ATP-Aufwand verläuft. Das Retentionsprofil des MK8 wurde stellvertretend für die gsh⁻ Mutanten dargestellt (Figur 3.3g,h); in den anderen Mutanten wurden ausnahmslos vergleichbar kleine Gipfel gefunden.

STAMM	PROTEIN (mg/ml)	DIPEPTID-KONZENTRATION (nmol/mg Prot.)	(%WT)	GSH-GEHALT (%WT)
RB1 (30 min)	3,3	32,8	100	100
RB1 (60 min)	3,3	46,4	100	100
MK8 (30 min)	4,9	2,1	6,5	4,8
MK37 (")	6,7	1,6	4,8	6,0
MK42 (")		nicht nachweisbar		
MK11 (")	6,8	1,2	3,6	2,2
MK13 (")	7,1	1,0	3,0	2,1

Tabelle 3.11 Absolute Konzentrationen des gebildeten Dipeptids γ -Glu-Cys in GSH⁺ und gsh⁻ Stämmen nach 30- bzw. 60minütiger Inkubationsdauer

Bei den gsh⁻ Stämmen resultierten die Angaben auf der Basis oberer Grenzwerte, da aus den kleinen Gipfeln die Flächenintegrale nicht mehr berechnet werden konnten. Die abgeschätzten Gipfelflächen bei den Mutanten waren für 30 min bzw. 60 min nicht unterschiedlich, so daß als Basis der Berechnung die 30 min-Werte dienten. Die Umrechnung aus den Flächen der Profile in Figur 3.3 auf die gebildete Dipeptidkonzentration erfolgte auf der Basis der Extinktion des Referenzmonomeren "Glutamat".

Beim Vergleich der 30 min und 60 min-Werte zeigte sich beim RBl keine lineare Zunahme des Dipeptids mehr, was auf die Wirkung von ATPasen zurückzuführen war und zur Verringerung der ATP-abhängigen Dipeptidsynthese führte. Die gsh⁻ Mutanten waren unter den gegebenen Bedingungen gleichermaßen stark in der Dipeptid-Synthese betroffen. Die Restaktivitäten der γ -GCS sind grob zu korrelieren mit den tatsächlichen residualen GSH-Gehalten dieser Stämme.

Die Ergebnisse der enzymatischen Analyse ergänzen die Komplementationsdaten der genetischen Analyse:

Alle fünf Stämme sind im gleichen Gen betroffen und offensichtlich defekt in einem Gen, das für die γ -GCS kodiert. Unerklärt bleibt damit die Beobachtung, daß sich diese Mutanten in ihren phänotypischen Eigenschaften zum Teil recht deutlich unterscheiden.

3.3.4. Glutathion-Synthetase (GSH-Synthetase)

Das Enzym GSH-Synthetase wurde bereits aus Hefe gewonnen und aufgereinigt (MOOZ und MEISTER, 1967; NISHIMURA et al., 1964; SNOKE, 1955).

Der von MOOZ und MEISTER (1967) verwendete Ansatz des Nachweises von markiertem Tripeptid



war auch die Basis für die Bestimmung der GSH-Synthetase-Aktivität in den Rohextrakten der gsh⁻ Mutanten und des Wildtyp-Referenzstammes (durchgeführt bei Prof. PENNINGX, Brüssel; siehe Tabelle 3.12).

STAMM	GSH-Synthetase ²⁾	
	(nmol/h x mg Protein)	(% WT)
RB1	241 $\pm$ 7,0 ¹⁾	100
PA3	214 $\pm$ 10,0	100
MK8	167 $\pm$ 7,2	69
MK37	60 $\pm$ 2,0	25
MK42	218 $\pm$ 8,0	91
MK11	221 $\pm$ 10,0	103
MK13	227 $\pm$ 2,0	106

Tabelle 3.12 GSH-Synthetase-Aktivitäten in GSH⁺ und gsh⁻ Stämmen

Die Stämme wurden in YEPD gezüchtet und aus der frühstationären Phase (1×10^8 N/ml) entnommen.

- 1) Die Standardabweichungen wurden berechnet aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.
- 2) Die spezifischen Aktivitäten beziehen sich auf die Produktbildung von Ophtalmsäure, welches die $1\text{-}^{14}\text{C}$ Markierung am Glycin aufweist.

Der Befund, daß in den zwei Stämmen MK8 und MK37 eine unterschiedlich stark verringerte Aktivität der GSH-Synthetase gefunden wurde, gibt den Hinweis auf die mögliche Beeinflussbarkeit des zweiten Syntheseschrittes durch die starke Blockierung des ersten.

3.3.5. γ -Glutamyl-Transpeptidase (γ -GTP)

Ein Defekt in der AA-Aufnahme, der zur GSH-Defizienz führt, war bei den Mutanten auszuschließen. Es war jedoch vorstellbar, daß fehlendes Substrat (GSH) zu einer Verringerung der postulierten hydrolytischen Aktivität und damit zu einer möglichen Erniedrigung des Enzymspiegels von γ -GTP führt. Dies sollte geprüft werden.

γ -GLUTAMYL-TRANSEPTIDASE

STAMM	spez. Aktivität			
	log Phase		stationäre Phase	
	(mU/mg Prot.)	(mU/10 ⁹ N)	(mU/mg Prot.)	(mU/10 ⁹ N)
RB1	0,45	3,0	1,30	3,2
MK8	0,50	3,6	1,60	4,0
MK37	0,24	1,4	1,00	2,4
MK42	0,46	2,7	0,90	3,7
MK11	0,20	1,1	0,63	1,8
MK13	0,27	1,2	0,60	3,3

Tabelle 3.13 γ -GTP-Aktivitäten in GSH⁺ und gsh⁻ Stämmen in verschiedenen Wachstumsphasen

Die Aktivitäten der γ -GTP wurden in log-Phase Zellen (1-3x10⁷ N/ml) bzw. in frühstationären Zellen (1-2x10⁸ N/ml) direkt in einer Küvette photometrisch (Double wavelength 405-500 nm) bestimmt.

Die spezifische Aktivität (mU/mg Protein; 1 mU = 1 nmol gebildetes p-Nitroanilin/min) bezieht sich auf den Proteingehalt im 100.000xg Überstand. Protein wurde nach der LOWRY-Methode bestimmt.

Die Daten der Tabelle 3.13 stammen aus einem repräsentativen Experiment, in dem alle Stämme gemeinsam gemessen wurden. Zwei weitere Versuche (mit größeren Ansätzen und photometrischer Endpunktbestimmung) bestätigten die gefundenen linearen Kinetiken für die Bildungsgeschwindigkeit des Nachweisproduktes p-Nitroanilin. Die Daten, die aus diesen Versuchsansätzen gewonnen wurden, wichen nur minimal von denen der Tabelle 3.13 ab.

Wachstumsabhängige Schwankungen der γ -GTP-Aktivität in Saccharomyces cerevisiae, wie sie hier gemessen wurden, konnten auch in anderen Hefestämmen beobachtet werden (C.J. JASPERS, persönliche Mitteilung). Die Ursache der erhöhten Aktivitäten in später Wuchsphase liegt möglicherweise in der Verarmung des YEPD-Mediums an NH₄⁺ Ionen, die auf die γ -GTP reprimierende Wirkung ausüben (JASPERS et al., 1985). Weitere Untersuchungen darüber wurden nicht angestellt.

3.3.6. GSH-S-Transferasen

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen konnte erstmals eine 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzol-(CDNB-)abhängige Aktivität im Diplonten D7 nachgewiesen werden. Die Bestimmung der GSH-S-Transferasen ergab in diesem Diplonten ein wachstumsunabhängiges Aktivitätsmuster (Tabelle 3.14). Die CDNB-abhängige Aktivität der GSH-S-Transferasen in Hefe ist, verglichen mit der in Säugerleber, relativ gering (ca. 2-4 mU/mg Protein gegen ca. 100 U/mg Protein aus Rattenleber-Homogenat; CHASSEAUD, 1979).

CDNB wird sowohl enzymatisch wie nicht-enzymatisch an GSH konjugiert (auch das zweifach chlosubstituierte Derivat DCNB wird mit vergleichbarer Aktivität umgesetzt; Daten nicht gezeigt). Andere Untersucher bestätigten diesen Befund der enzymatischen CDNB-Konjugation in anderen Hefestämmen (JASPERS und PENNINCKX, 1982) und zeigten zugleich nach Testung weiterer Substanzen, von denen bekannt war, daß sie in Säugerzellen durch GSH-S-Transferasen enzymatisch an GSH konjugiert werden (4-Nitropyridine-N-Oxid, 1,2-Epoxy-3(p-Nitrophenoxy)-Propan, p-Nitrobenzylchlorid, Trans-4-Phenyl-3-Buten-2-Eins und Menaphtylsulfat), daß die GSH-S-Transferasen aus Hefen diese Substrate nicht (meßbar) umsetzen.

GSH⁺ Diplonten (D7) wie Haplonten (RBl) zeigten wuchsphasenunabhängige und auch vergleichbare GSH-S-Transferasenaktivitäten (Tabelle 3.14). Zwei von den drei untersuchten GSH-defizienten Haplonten hatten gegenüber dem Wildtyp RBl verringerte Aktivitäten, speziell die gsh⁻ Haplonten MK11 und MK13. Auch der Bezug auf andere Einheiten (Zelltiter, Trockengewicht) führte zu dieser Aktivitätsverringering (Daten nicht gezeigt), so daß von einer intrazellulären Konzentrationsverringering der GSH-S-Transferasen in diesen Mutanten ausgegangen werden kann.

Die in den Mutanten MK11 und MK13 verringerte Aktivität kann zusammenhängen mit deren starken GSH-Depletion. Auch die Aktivitäten der GR und γ -GTP waren in diesen Mutanten reduziert.

STAMM	GSH-S-TRANSFERASEN		
	(mU/10 ⁹ Z.)	(mU/mg Protein)	%WT
D7	12,4 $\pm$ 1.3	2,24 $\pm$ 0.45	100
RB1	9,7	2,3	100
PA3	10,5	2,2	100
MK8	11,6	2,4	104
MK11	7,6	1,8	82
MK13	3,0	1,1	49

Tabelle 3.14 GSH-S-Transferase-Aktivität (CDNB-abhängig) in GSH⁺ und gsh⁻ zellen

Die Aktivitäten wurden im 100.000xg Überstand French Press aufgeschlossener stationärer Zellkulturen bestimmt. Der Test wurde nach Habig et al. (1974) durchgeführt. Die Daten repräsentierten Mittelwerte aus 2 unabhängig durchgeführten Experimenten und im Fall des D7 aus 6 Experimenten $\pm$ SD.

Die Ergebnisse aus den enzymatischen Messungen werden nachfolgend zusammengefaßt.

STAMM	γ -GCS	GSH-Synt.	γ -GTP	GR	GSH-S-Transf.
			% WILDTYPE-AKTIVITÄT		
RB1	100	100	100/100	100	100
PA3	-	100	- / -	-	100
MK8	7	69	111/123	41	104
MK37	5	25	53/ 76	105	-
MK42	0*	91	102/ 70	28	-
MK11	4	103	44/ 48	64	82
MK13	3	106	60/ 46	33	49

Tabelle 3.15 Aktivitäten von Enzymen des GSH-Metabolismus in GSH⁺ und gsh⁻ Haplonten (in Prozenten der Aktivität des Wildtyps)

* nicht nachweisbar

- nicht bestimmt

γ -GTP: log Phase/stat. Phase

3.3.7. Möglichkeiten zur Kompensation der GSH-Defizienz

Genetische Defekte werden häufig kompensiert durch Mutationen in einem zweiten Gen, d.h. durch Suppression auf translati-onaler Ebene (sog. "Supersuppression") oder Öffnung alternativer Stoffwechselwege (metabolische Suppression). Es war denkbar, daß auch GSH-defiziente Zellen ein solches Verhalten zeigen, um den Auswirkungen einer starken GSH-Depletion zu entgehen. So gab es aus den vorliegenden Untersuchungen einige Hinweise, die für eine mögliche Suppression der GSH-Defizienz sprachen.

1. Haplonten

Die gsh⁻ Mutanten MK11, MK13 und MK42 neigten in unterschiedlichen Maße dazu, in ihren Populationen Zellen mit deutlich verbesserten, d.h. dem GSH⁺ Wildtyp gleichenden Wachstumseigenschaften anzureichern.

Diese Zellen zeigen eine MNNG-Sensibilität, die der eines Wildtyps entspricht; jedoch erwies sich bei biochemischer Testung, daß sie nicht den GSH-Gehalt des Wildtyps hatten, sondern nur 15% Restgehalt (im Vergleich zu 2-5% Rest-GSH, wie es die gsh⁻ Mutanten zeigen). Offenbar reicht ein vergleichsweise niedriges GSH Niveau von 10-15% dazu aus, die Wachstumseigenschaften des GSH⁺ Stammes wiederherzustellen.

Die Vermutung, daß es sich nicht um eine Rückmutation in den verschiedenen gsh1-x Allelen, sondern um eine Zweitmutation in einem weiteren (unbekannten) Gen handelt, wurde durch genetische Analyse bestätigt: Bei der Kreuzung eines vermutlichen Suppressorstamms (MK13-2D) mit dem Ursprungsisolat MK13, aus dem er zufällig entstanden war und durch seine MNNG-Sensibilität erkannt wurde, ergab sich im Diplonten ein GSH-Gehalt von ca. 15% Rest-GSH gegenüber dem Diplonten D7. Daraus ist auf die Dominanz des möglichen Suppressors im Diplonten zu schließen. In der Sporenanalyse zeigte sich bei 6 getesteten Tetraden in allen Fällen eine 2 : 2 Segregation von gsh⁻ : gsh⁻ SUP (phänotypisch GSH⁺).

Auch in heteroallelischen Kreuzungen (MK37 x MK13-2D sowie MK42 x MK13-2D) ergab sich bei 21 getesteten Tetraden ausnahmslos ein 2:2 Segregationsmuster von gsh⁻ : gsh⁻ SUP. Da es sich bei diesen 3 Allelen um unabhängige Isolate handelt, erscheint es als wahrscheinlich, daß dieser dominante Suppressor metabolischer und nicht translationaler Natur ist. Die Stämme MK11 und MK42 wurden hier aufgrund ihrer schlechten Kreuzbarkeit und Manipulierbarkeit in der Sporenanalyse nicht weiter untersucht.

Die Frage, worin die Fähigkeit der supprimierten gsh⁻ Mutanten zur Rekonstitution des GSH-Niveaus auf ca. 15% des Wildtyps besteht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht detailliert untersucht werden. Es ist nicht auszuschließen, daß dies durch erhöhte Akkumulation anderer SH-haltiger, niedermolekularer Substanzen (NPSH) geschieht, die in den Ursprungsisolaten nicht zu beobachten war (siehe 3.1.2.1.).

Es gibt Hinweise aus den Aufnahmestudien der GSH-Vorstufen im supprimierten Stamm MK13-2D, daß dieser Stamm die drei Vorstufen Glycin, Glutamat und Cystein in größeren Mengen als der GSH⁺ Stamm und die nicht supprimierten gsh⁻ Mutanten aufnimmt (Tabelle 3.10).

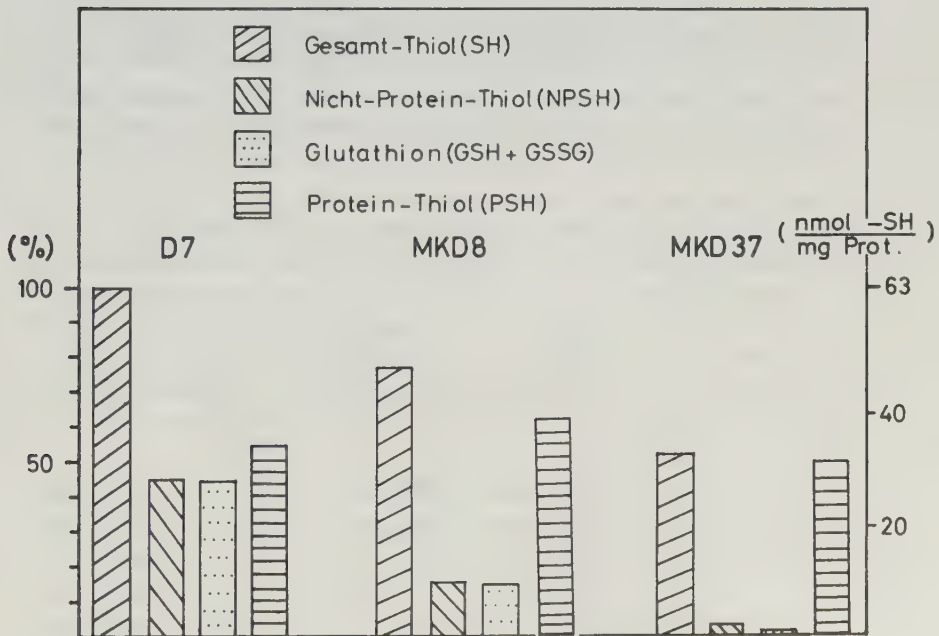
2. Diplonten

Bei der Konstruktion von homozygoten gsh⁻ Diplonten (siehe 3.4.3.2.) zeigte sich - unabhängig von ihrem sonstigen genetischen Hintergrund - daß sie in ihren Wachstumseigenschaften den entsprechenden GSH⁺ Wildtypstämmen gleichen, während gsh⁻ Haplonten in ihrem Wachstum doch stark eingeschränkt waren.

Der MKD8 hatte einen relativ hohen GSH-Restgehalt von 32% (bezogen auf den GSH⁺ Diplonten), der MKD37 jedoch nur 3%. Das Ergebnis ist überraschend, da sich die beiden gsh⁻ Diplonten in ihren Wuchseigenschaften nicht unterscheiden und beide aus haploiden Parentalstämmen mit sehr geringen GSH-Gehalten um 4,8% bzw. 6% hervorgegangen sind.

Messungen der Nicht-Protein-Thiol- und Protein-Thiol-Gehalte (NPSH und PSH) (Figur 3.4) ergaben:

- Die gsh⁻ Diplonten waren in ihrem Gesamt-Thiol-Gehalt (TSH = Summe aus Nicht-Protein-Thiol [NPSH] und Protein-Thiol [PSH]) nur geringfügig herabgesetzt (77% für MKD8 bzw. 52% für MKD37).
- Die Reduktion des Gesamt-Thiols kam ausschließlich durch die Verringerung des NPSH zustande. In allen drei Stämmen war der NPSH-Anteil nahezu identisch mit dem GSH-Gehalt. Das bedeutet, daß die gsh⁻ Diplonten keine metabolische Suppression, z.B. durch Akkumulation anderer SH-haltiger Verbindungen (Cys, γ -Glu-Cys, Cys-Gly) zeigen.
- Der PSH-Anteil war in allen drei Stämmen vergleichbar hoch.



Figur 3.4 Thiolgehalte des GSH⁺ Wildtyps D7 und der diploiden gsh⁻ Stämme MKD8 und MKD37 (Mittelwerte aus zwei Experimenten)

3.4. Untersuchungen über die Rolle von GSH im Fremdstoff-metabolismus und dessen Beeinflussung sowie über die Schutzwirkung gegenüber ionisierenden Strahlen

3.4.1. Chemikalienversuche

Die vorgestellten Untersuchungen zum GSH-vermittelten Stoffwechsel von Xenobiotika können aufgrund der gewählten Substanzen in 2 Gruppen eingeteilt werden:

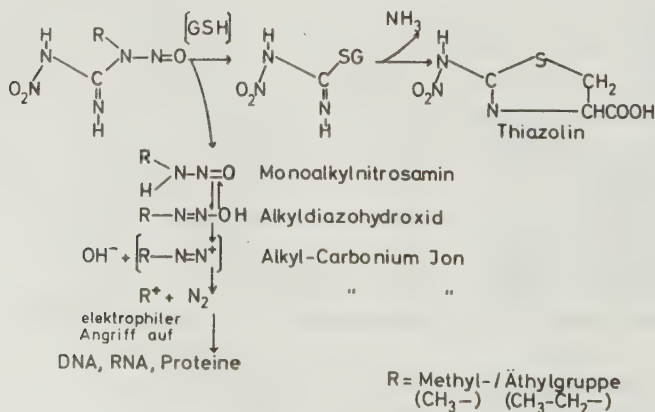
1. GSH-vermittelte Xenobiotika-Aktivierung
2. " " " " -Inaktivierung

Zum Einsatz kamen haploide und diploide GSH⁺ Stämme (D7, RBl, PA3) mit unterschiedlichen GSH-Gehalt (bedingt durch die jeweilige Wuchsphase oder chemische Depletion) und in vergleichenden Untersuchungen GSH-defiziente Stämme.

3.4.1.1. Reaktion von GSH mit Nitrosoguanidinen (NG)

Als Modellsubstanzen für die Testung der aktivierenden Fähigkeit von GSH in vivo wurden die DNA-alkylierenden Agentien MNNG und ENNG (siehe Abkürzungsverzeichnis) gewählt.

Die an der DNA agierenden Alkylreste CH_3^+ (aus MNNG) bzw. $\text{CH}_2\text{-CH}_3^+$ (aus ENNG) werden über die wahrscheinliche Reaktionsfolge der Figur 3.5 gebildet (MARGISON und O'CONNOR, 1979).



Figur 3.5 Aktivierungsmechanismus von Nitrosoguanidinen durch GSH (MARGISON und O'CONNOR, 1979)

Während in Bakterien der molekulare Mechanismus der MNNG-Mutagenese (Replikationsgabelmutagenese; BOTSTEIN und JONES, 1969; CERDA-OLMEDO et al., 1968; GUEROLA et al., 1971; NESTMAN, 1975) und deren induzierbarer Reparaturphänomene (z.B. FOSTER und EISENSTADT, 1985; "adaptive response", SEDGWICK und ROBINS, 1980) ziemlich gut bekannt ist, sind in Hefen viele Fragen ungeklärt.

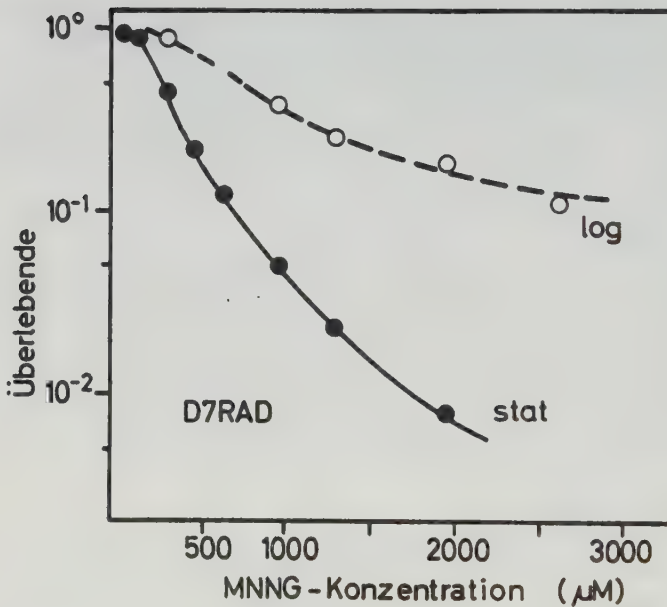
Bekannt ist, daß Kerngene der Hefe in der S-Phase des Zellzyklus etwa 10fach sensibler gegenüber NG-Mutagenese sind als andere Phasen des Zyklus, was auf einen zu Bakterien analogen Mechanismus der Replikationsgabelmutagenese hinweist, obwohl andere Stadien des Zellzyklus auch auf Muta-genbehandlung ansprechen (BURKE und FANGMAN, 1975).

Wuchsphasenabhängigkeit

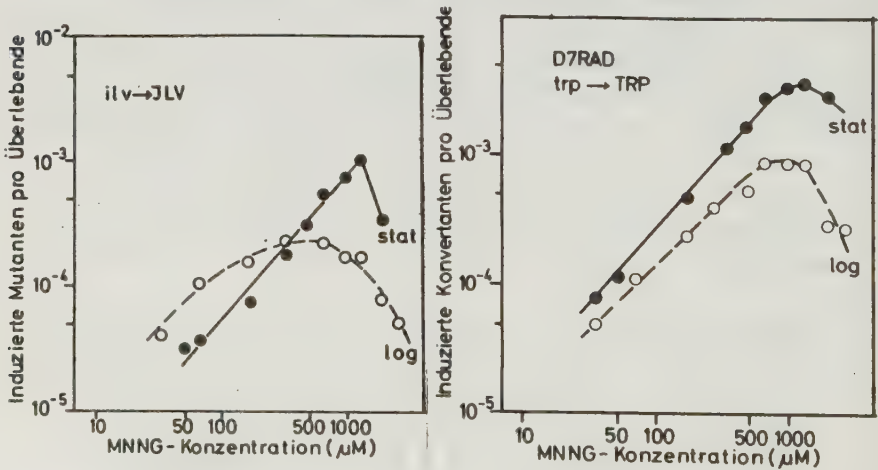
Bei dem Stamm D7 wurde in stationären Zellen eine wesentlich höhere Toxizität des MNNG gefunden als in exponentiell wachsenden (Figur 3.6). Dies steht entgegen dem vielfachen Befund einer höheren Sensibilität exponentieller Zellen gegenüber mutagenen Agentien (ZIMMERMANN et al., 1982).

Auch die Mutations- und Rekombinationsfrequenzen waren in stationären Zellen höher als in exponentiellen (Figur 3.7). Bestimmungen von GSH in Zellen unterschiedlicher Wuchsphase ergaben sich deutlich unterscheidende Konzentrationen (Tabelle 3.17); es ist zu vermuten, daß GSH der von CALDERON und CERDA-OLMEDO (1983) vermutete "cytoplasmatische Faktor" darstellt, der die genotoxische Wirkung von MNNG beeinflußt.

Umgekehrt lagen die Mutationsfrequenzen (Ilv) im niedrigen Dosisbereich in exponentiellen Zellen allerdings höher als in stationären. In diesem Dosisbereich unterscheiden sich die Überlebenskurven dieser beiden Populationen kaum. Eine gegenüber stationären Zellen erhöhte Zahl prämutagener Schäden mit anschließender Fehlreplikation im Sinne der Replikationsgabelmutagenese ist nicht auszuschließen.



Figur 3.6 Überleben stationärer und exponentieller zellen des Diplonten D7 nach 30 min Inkubation mit MNNG



Figur 3.7 MNNG-induzierte Mutation (ilv) und Konversion (trp) im D7 in stationärer und exponentieller Wachstumsphase

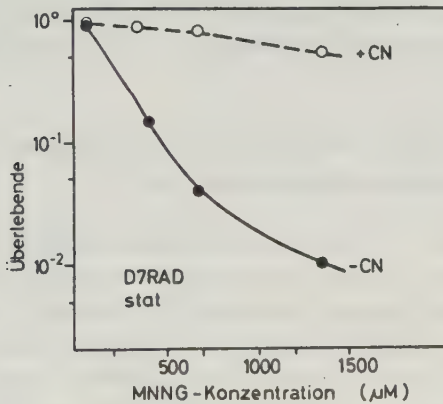
Eine Bestätigung der Hypothese, daß GSH der cytoplasmatische Modifikator ist, brachte eine Vorbehandlung der Zellen mit Chloracetophenon, welches kovalent an GSH bindet (CHASSEAUD, 1979). Der GSH-Gehalt wurde dabei allerdings nur auf 21% in logarithmischen und auf 44% in stationären Zellen gesenkt (Tabelle 3.16).

INKUBATION	CN (μ M)	GSH (nmol/ 10^9 N)	
		log	stationär
-	-	256 $\pm$ 19 ¹⁾	337 $\pm$ 30
	150	140	255
	300	56	148

Tabelle 3.16 GSH-Gehalte in exponentiellen und stationären Plattenkulturen des D7 nach GSH-Senkung mit Chloracetophenon (CN)

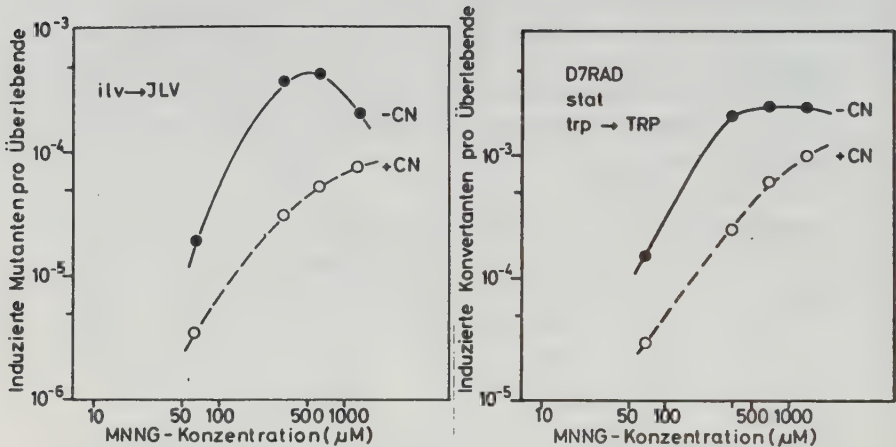
¹⁾ Mittelwerte + Standardabweichung (n=4)

Die Zellen wurden 30 min in Puffer mit CN vorinkubiert



Figur 3.8 Überleben von Zellen aus stationären Plattenkulturen des D7 nach MNNG-Behandlung mit bzw. ohne CN-Vorinkubation

Die cytotoxische Wirkung von MNNG ist in CN-vorbehandelten Zellen erheblich reduziert (Figur 3.8) und die genetische (Figur 3.9a,b) ebenfalls eingeschränkt.



Figur 3.9a,b MNNG-induzierte Mutation (Ilv) und Genkonversion (Trp) in Zellen aus Plattenkulturen des diploiden D7 mit bzw. ohne CN-Vorinkubation

Diese Resultate stimmen mit der Erwartung überein, daß die GSH-Konjugation die DNA-alkylierende Aktivität von MNNG in vivo vermittelt.

Untersuchungen des GSH-Gehalts in Abhängigkeit von der Wachstumsphase in kontrollierten Fermentationen

Der GSH-Gehalt einer normalen Schüttelkultur nimmt im Laufe des Wachstums ständig zu und erreicht in Zellen der stationären Wachstumsphase ein Maximum (Tabelle 3.17). Die gleiche Situation war auch bei Zellen aus Plattenkulturen zu beobachten, wenn auch hier die zellulären Gehalte in stationärer Phase niedriger waren (ca. 380 nmol/10⁹ N) als in Flüssigkulturen.

WACHSTUMSPHASE		GSH-GEHALT (nmol/10 ⁹ N)
exponentiell	(2x10 ⁷ N/ml)	260 $\pm$ 19 ¹⁾
spätlogarithmisch	(9x10 ⁷ ")	377 $\pm$ 30
stationär	(2x10 ⁸ ")	1090 $\pm$ 260

Tabelle 3.17 GSH-Gehalte des diploiden Stammes D7 in verschiedenen Wachstumsphasen aus normalen Schüttelkulturen (unkontrollierte "batch"-Kulturen)

1) Mittelwert $\pm$ SD, n=4

Animpftiter: 1x10⁶ N/ml, so daß bei der ersten Zellernte in exponentieller Phase die Biomasse etwa um Faktor 10 zu- genommen hatte (damit sollte ein möglicher Einfluß der Zahl der Zellteilungen auf die GSH-Produktion eliminiert werden, da sich während der ersten drei Zellteilungen die Wachstums- rate μ ändert).

Die GSSG-Gehalte lagen in Flüssigkulturen wuchsphasenunab- hängig bei ca. 5% des Gesamt-GSH.

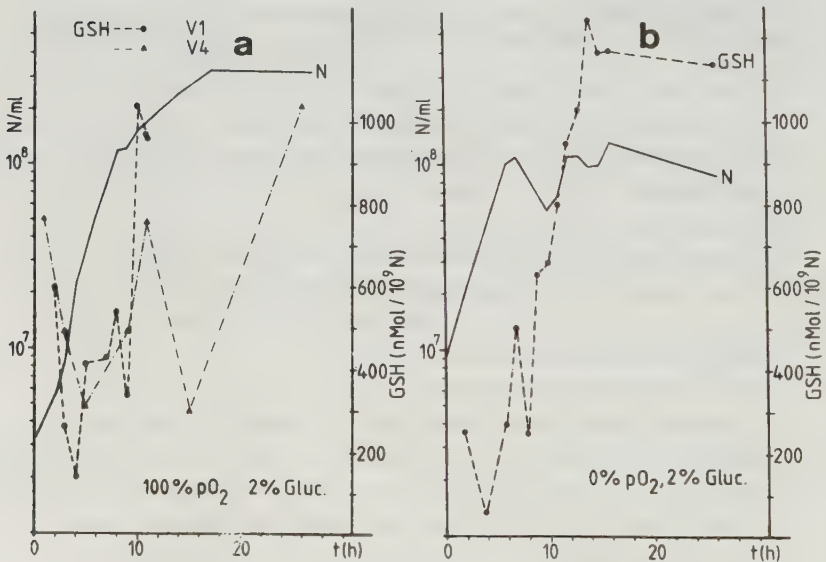
Zu Fermentationen, die als kontrollierte "batch"-Kulturen, d.h. statische Kulturen mit normalen Wuchsverlauf (lag-, log- und stationäre Phase), oder kontinuierliche Kulturen in Zusammenarbeit mit Dr. BERTHE-CORTI, Universität Oldenburg, durchgeführt wurden, konnten die Veränderungen des GSH-Ge- haltes im Verlauf des Wachstums einer Kultur sowie unter verschiedenen Anzuchtbedingungen genauer verfolgt werden. Die Ergebnisse aus der batchweisen Anzucht lassen sich fol- gendermaßen zusammenfassen:

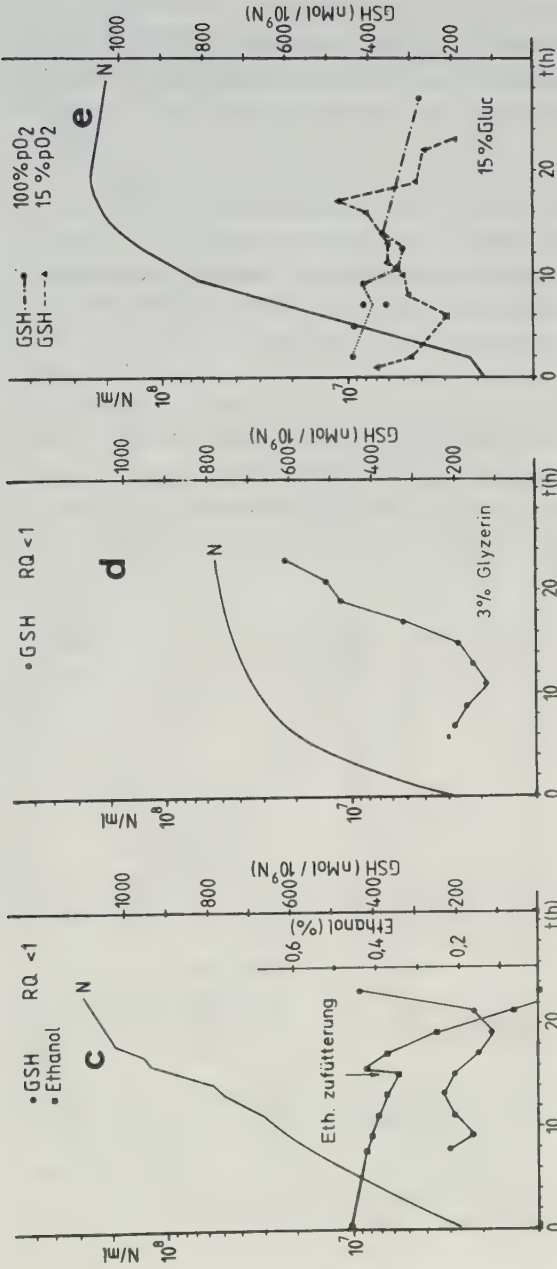
1. Der GSH-Gehalt von Zellen in normalen YEPD-Medien ändert sich im Laufe einer batch-Kultivierung sowohl unter optimaler Sauerstoffversorgung als auch unter anoxischen Bedingungen (Figur 3.10a und 3.10b): in exponentieller Wachstumsphase oszilliert er mehr oder weniger stark und ak- kumuliert schließlich in stationärer Wachstumsphase.
2. Durch die Wahl der Anzuchtbedingungen läßt sich der intrazelluläre GSH-Gehalt gezielt verändern. So kann in aeroben Kulturen die GSH-Akkumulation in der log-Phase unterdrückt oder verzögert werden, wenn Zellen in einen

ausschließlich oxidativen Stoffwechsel gezwungen werden (Figur 3.10c und 3.10d; oxidativ verwertbare C-Quellen wie Ethanol und Glycerin).

Eine stabile GSH-Reprimierung jedoch kann nur durch hohe Glukosekonzentrationen ("Glukose-Repression") erreicht werden (3.10e).

3. GSH wird in stationärer Phase je nach Versuchsansatz in unterschiedlichen Konzentrationen akkumuliert. Deshalb sind GSH-Anreicherungen in der Zelle durch geeignete Verfahren möglich, z.B. über Zufütterung von Cystein (HAMADA et al., Pat.Nr. EPO 079241A2), geeignete Fermentationsbedingungen (MURATA et al., 1978, 1980) und neue Fermentationsverfahren (BAUER und KIRK, 1985a,b).





Figuren 3.10a-e GSH-Gehalte und Wuchskurven des D7 während der Fermentation im batch-Betrieb unter unterschiedlichen Bedingungen

N = Zellzahl

a GSH-Gehalte aus 2 Versuchen mit 100% Sauerstoffpartialdruck (pO_2) in YEPD (2% Glc)

b wie a, mit 0% pO_2 (Anaerobiosis durch N_2 -Belüftung)

c oxidativer Stoffwechsel ($RQ < 1$) mit Ethanol als Kohlenstoffquelle (im Züchtungsverfahren/fedbatch)

d wie c, mit 3% Glycerin als C-Quelle (Anfangskonzentration; nicht zugefüttert)

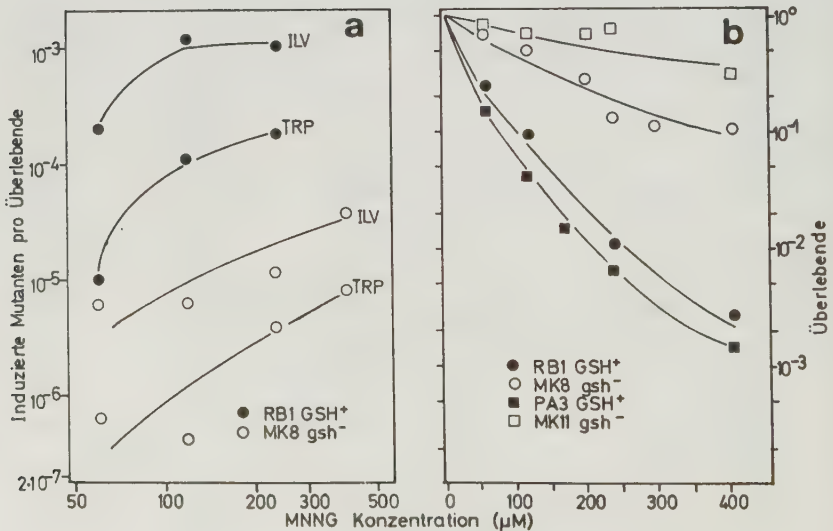
e Glukose-Repression (15%; fedbatch)

Zur Untersuchung GSH-abhängiger Prozesse ist es daher wichtig, diese an die Wachstumsphase zu koppeln und Zellen aus definierten Phasen und unter definierten Anzuchtbedingungen zu verwenden.

Vergleichende Untersuchungen mit GSH^+ und gsh^- Zellen

Mit dem Einsatz glutathiondefekter Mutanten (gsh^-) kann durch vergleichende Untersuchungen mit dem GSH^+ Wildtyp die Wirkung der GSH-Depletion auf Überleben und Mutabilität von Zellen studiert werden.

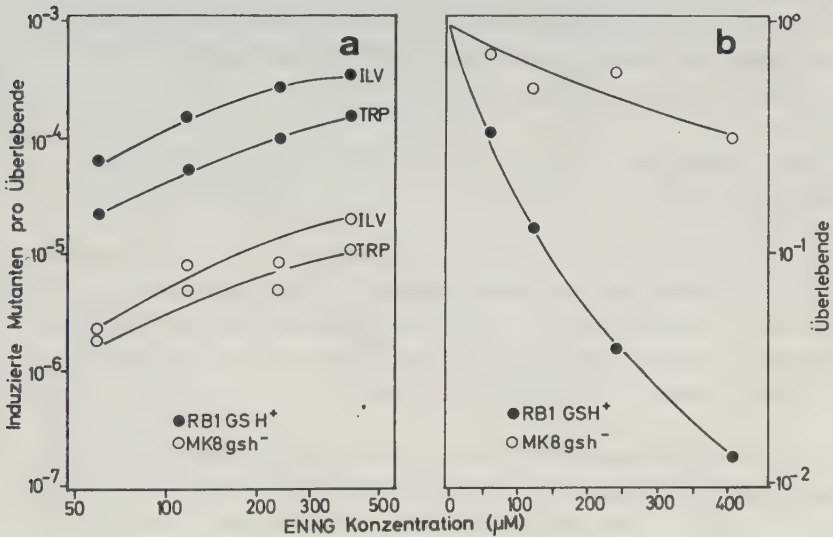
Der GSH-Restgehalt in diesen Mutanten sollte nicht mehr beeinflusst werden durch Stoffwechselphänomene, die z.B. aus Wachstumsphasenübergängen (GSH-Oszillationen in exponentieller oder GSH-Akkumulation in stationärer Wachstumsphase bei GSH^+ Wildtypen) oder aus Seiteneffekten chemischer Depletoren resultieren.



Figur 3.11a,b Mutationsinduktion (a) und Überleben (b) bei GSH^+ und gsh^- Haplonten aus spätexponentiellen Flüssigkulturen nach 2 h MNNG-Behandlung

Figur 3.11a demonstriert die durch GSH-Mangel verursachte Resistenzerhöhung und stark verringerte Mutationsinduktion (3.11a) der genetisch depletierten Stämme gegenüber MNNG. Auch hier korrespondieren GSH-Gehalt und Zellinaktivierung (3.11b).

Bei ENNG, dem ethylsubstituierten NG-Derivat, lassen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den GSH-prototrophen und -auxotrophen Stämmen feststellen (Figur 3.12a und 3.12b), allerdings scheint MNNG im Vergleich der beiden Alkylantien in beiden Stämmen offenbar das stärker letal wirkende Agens zu sein (ca. 10fach; siehe Figur 3.11b und 3.12b).



Figur 3.12a,b Mutationsinduktion (a) und Überleben (b) bei GSH⁺ und gsh⁻ Haplonten aus spätexponentiellen Flüssigkulturen nach ENNG-Behandlung

ILV bzw. TRP stehen für Reversionsergebnisse (Wachstum auf Isoleucin/Valin- bzw. Tryptophanfreien synthetischen Medien) in den Auxotrophiemarkern ilv1-92 (Mutation) und trp5-12 bzw. 5-27 (in Haplonten ebenfalls Mutationsmarker).

Überlebenskurven beider Stämme mit Ethyl-Nitro-Nitrosoguanidin (ENU), welches ebenso wie MNNG und ENNG als alkylierende mutagene Substanz gilt (alkyliert in vitro vorwiegend O⁶ und N⁷ von Guanin, zugleich in hoher Frequenz die Diesterstelle der Phosphatbrücke; SINGER, 1972), zeigten nur geringe Unterschiede. Daraus ist zu folgern, daß ENU in Hefe nicht durch GSH metabolisiert wird. Auch war die toxische Aktivität von ENU deutlich geringer als die von ENNG und MNNG, was mit den Resultaten aus Bakterienversuchen übereinstimmt (KERKLAAN et al., 1983; MOHN et al., 1983). Im untersuchten Konzentrationsbereich bis 400 µM ging die Mutations"induktion" über den Faktor 1,5-2,0 nicht hinaus (Daten aus 4 unabhängigen Versuchen; nicht gezeigt), so daß unter diesen experimentellen Gegebenheiten ENU im Gegensatz zu Bakterien (MOHN, 1983) als nicht oder zumindest kaum mutagen in Hefe zu betrachten ist.

Konstruktion und Einsatz von gsh^- Diplonten für Mutagenitätstestungen

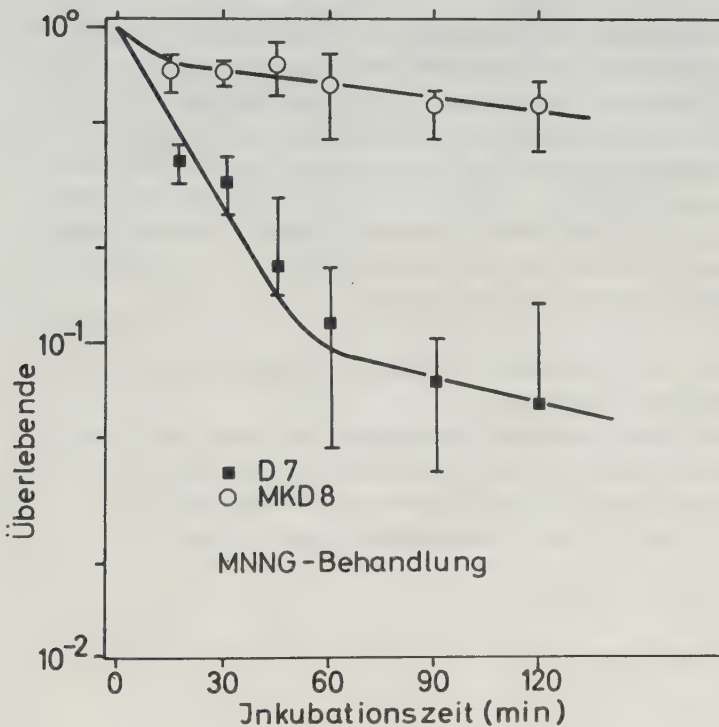
Eine der Aufgaben im Rahmen dieser Arbeit war es, homozygote gsh^- Diplonten mit dem genetischen Hintergrund des für Mutagenitätstestungen vielfach eingesetzten Teststammes D7 zu konstruieren, um sie für vergleichende Testungen mit dem Originalstamm D7 einsetzen zu können.

Zunächst wurde versucht, aus Stämmen, die im Rahmen der Komplementationsanalyse konstruiert worden waren und die die genetischen Marker des D7 besaßen, jedoch heterozygot GSH^+ gsh^- waren, durch UV- und γ -Strahlen induzierte/spontane mitotische Rekombination bzw. Genkonversion (MORTIMER und HAWTHORNE, 1969) homozygote gsh^- gsh^- Diplonten zu erhalten. Da diese Strategie nicht erfolgreich war, wurde zur Konstruktion der Diplonten folgende Strategie eingeschlagen:

- a) Reinigung des genetischen Hintergrunds geeigneter gsh^- Haplonten durch Kreuzen mit dem Wildtypstamm S 288-C
- b) Sporulation des Diplonten und Selektion von gsh^- Sporen ohne Auxotrophien

- c) Einkreuzen der Sporen in die haploiden Elternstämme der gsh⁻ Stämme (BK RBl bzw. BK PA3)
- d) Sporulation der Diplonten und Selektion von gsh⁻ Sporen mit geeigneten Auxotrophien
- e) Kreuzung der gsh⁻ Haplonten zum Diplonten D7
gsh⁻ gsh⁻

Zwei GSH-defiziente D7-Derivate mit dem homozygoten gsh⁻ Hintergrund des MK8 (gsh1-1) und MK37 (gsh1-2) wurden konstruiert und dem diploiden Status entsprechend als MKD8 und MKD37 bezeichnet. Der homozygote gsh⁻ Diplont MKD8 wurde für einige vergleichende Untersuchungen mit MNNG eingesetzt.



Figur 3.13 Überleben von GSH⁺ und gsh⁻ Diplonten nach zeitabhängiger MNNG-Inkubation (180/ μ M) (Mittelwerte aus drei Experimenten $\pm$ SD)

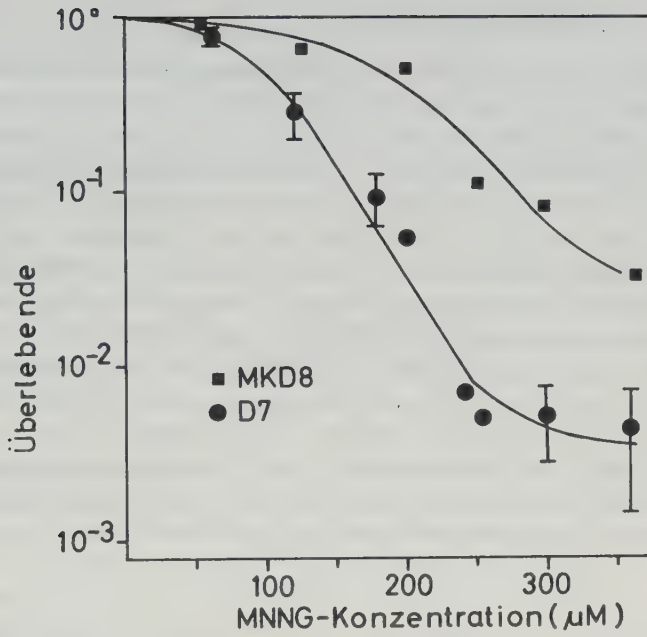
Zeitabhängige MNNG-induzierte Zellinaktivierung (bei gleichbleibender Konzentration) zeigte einen biphasischen Kurvenverlauf mit einer anfänglich schnellen und einer langsamen Komponente (Figur 3.13).

Der anfänglich steile Verlauf der Kurve repräsentiert offenbar den GSH-abhängigen Aktivierungsmechanismus, da dieser Abschnitt in der Kurve des MKD8 nur angedeutet war. Dieser GSH-abhängige Aktivierungsprozess ist im Wildtyp nach etwa 60 min abgelaufen. Die langsame Komponente zeigte in beiden Zellsystemen die gleiche Steigung und repräsentiert wahrscheinlich GSH-unabhängige Prozesse.

Der unterschiedliche intrazelluläre GSH-Gehalt führte analog zu Haplonten auch in Diplonten zu unterschiedlichen Antworten gegenüber MNNG (Figur 3.14). Die Überlebenskurven beider diploiden Stämme waren jedoch gekennzeichnet von einem Schulterbereich, der in Haplonten nicht beobachtet werden konnte (nicht gezeigt). Zu diesem Befund kann gegenwärtig keine ausreichende Erklärung gegeben werden, obwohl DNA-Reparaturphänomene für die Diplonten nach Inkubation im Niedrigdosisbereich denkbar sind.

Die Mutations- und Rekombinationsfrequenzen beider Stämme unterschieden sich deutlich.

Die Mutations-/Rekombinationsfrequenzen (induziert) bei $250\text{ }\mu\text{M}$ MNNG lagen im GSH⁺ Stamm bei $2,6 \times 10^{-2}$ (Ilv) bzw. 8×10^{-2} (Trp), im gsh⁻ Stamm dagegen nur bei $3,8 \times 10^{-3}$ bzw. $3,0 \times 10^{-3}$ (Ergebnisse nicht gezeigt).



Figur 3.14 Überleben von GSH^+ und gsh^- Diplonten nach 2 h MNNG-Behandlung (Mittelwert aus zwei bzw. 5 Versuchen $\pm$ SD)

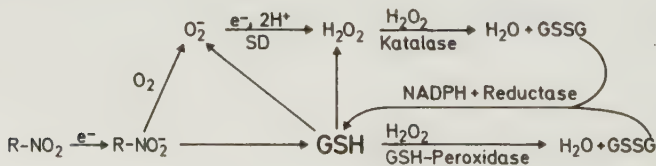
3.4.1.2. Bioinaktivierung durch GSH

Für diese Versuche wurden die Nitroaromaten CDNB und FDNB verwendet, bei deren intrazellulären Metabolisierung GSH mehrfach eingreifen kann.

Einerseits werden sie in vitro an GSH konjugiert (KETTERER, 1982) und auch in vivo (Säugerzellen und Bakterien) durch diese Konjugation entgiftet (BOYLAND und CHASSEAUD, 1979; JAKOBY, 1978; SUMMER et al., 1980). Dabei wird der Halogensubstituent am Cl-Atom des Aromaten in einer nucleophilen Austauschreaktion durch GSH ersetzt (SN₂-Reaktion), was nicht nur spontan, sondern auch enzymatisch durch GSH-S-Transferasen geschehen kann. GSH-S-Transferasen, die CDNB umsetzen, wurden sowohl in Säugerzellen (HABIG et al., 1974; HABIG, 1983) als auch in Prokaryonten (SUMMER und GÖGGELE-MANN, 1980) nachgewiesen. Auch in Hefe ließ sich im Rahmen dieser Arbeit eine CDNB-abhängige GSH-S-Transferase nachweisen (siehe Punkt 3.3.6).

Andererseits gelten bestimmte Nitroaromaten, zu denen auch CDNB gehört, als Peroxidproduzenten und Radikalbildner, was die (umstrittene!) DNA-schädigende Wirkung dieser Substanzen ausmachen könnte (BIAGLOW et al., 1983b).

Der postulierte radikalgenerierende Mechanismus läuft über einen Einzelelektronenübergang auf eine der NO₂-Substituenten am Ring (z.B. durch die Flavingruppe der NADPH-Cytochrom C Reduktase; BACHUR et al., 1979).



Figur 3.15 Postulierte Beteiligung von GSH im Metabolismus von Nitroaromaten (nach BIAGLOW et al., 1983b)

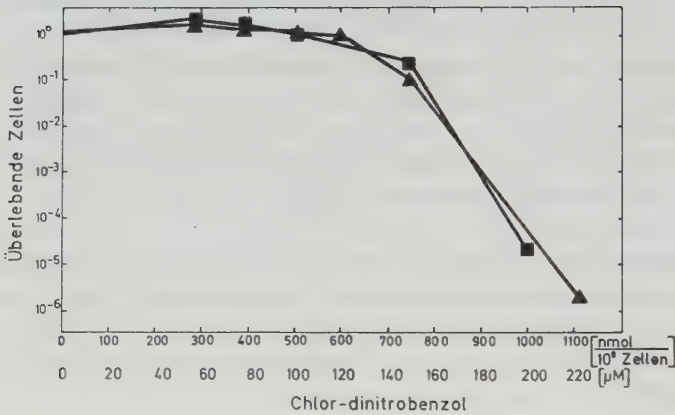
SD = Superoxiddismutase

Wie in Figur 3.15 zu sehen ist, kann dann GSH auf verschiedenen Stufen mit den reaktiven Metaboliten (reduzierte Nitrogruppen und O_2 Metaboliten wie Superoxid, Hydroxylradikal, Peroxid und aktivierten O_2) reagieren (2-Elektronenübergänge, die zu Nitrosaminmetaboliten führen können, wurden hier nicht dargestellt). Auch die GSH-Peroxidase benötigt für die H_2O_2 Reduktion GSH als Kofaktor.

Der Diplont D7 zeigte nach CDNB-Behandlung Überlebenskurven, die eine ausgeprägte Schulter aufwiesen und in einem kritischen Konzentrationsbereich von ca. $160 \mu M$ sehr steil fielen (Figur 3.16). Es gibt folgende Interpretationsmöglichkeiten:

1. Die ausgeprägte Schulter erstreckt sich bis zu einer Konzentration von ca. 160 nmol/ml ($=160 \mu M$) CDNB. Da pro ml 2×10^8 Zellen für den Versuch eingesetzt wurden, betrug die CDNB-Konzentration $800 \text{ nmol}/10^9 \text{ N}$. Dies ist annähernd äquimolar zu den GSH-Gehalten stationärer Flüssigkulturen. Die breite Schulter ist also wahrscheinlich bedingt durch die Schutzwirkung des GSH.
2. Der plötzliche steile Abfall der Überlebenskurven könnte darauf hindeuten, daß eine starke Proteindenaturierung vorliegt (cytoplasmatischer Effekt).

Die genetischen Testungen mit dem D7 waren negativ in allen drei untersuchten Markern: CDNB wirkt in Hefe weder mutagen noch rekombinogen. Die leichte Erhöhung um Faktor 1.5-1.8 lag im "Rauschbereich" und ist nicht als Induktion zu betrachten. Auch im Konzentrationsbereich, in dem die Schulter in den steilen Kurventeil übergeht ($600-800 \text{ nmol}/10^9 \text{ N}$), war keine Mutationsinduktion festzustellen.



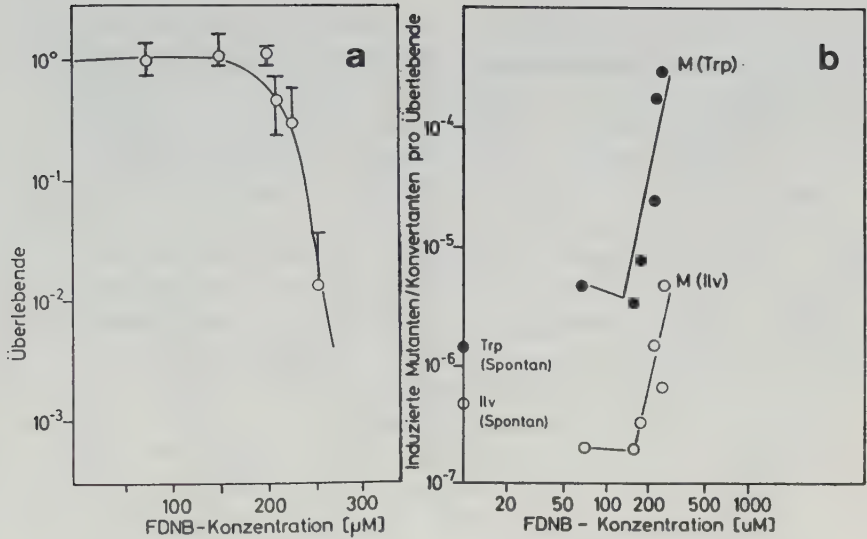
Figur 3.16 Überleben des D7 nach 2- (▲) und 24-(■)stündiger Inkubationszeit mit CDNB (Mittelwerte aus je fünf Versuchen)

Eingesetzt wurden stationäre YEPD-Flüssigkulturen (2×10^8 N/ml). Während die Schwankungen um die Mittelwerte im Schulterbereich der Kurven sehr gering waren (ca. 10%), schwankten die Werte im hohen Dosisbereich (220 bzw. $220 \mu\text{M}$) um Faktor 15 (2 h) respektive 10 (24 h).

Aufgrund der fehlenden genotoxischen Wirkung von CDNB sollte geprüft werden, ob CDNB in der Lage ist, in Hefe effizient genug zu penetrieren und GSH zu senken.

Es zeigte sich bei Gabe von GSH-äquimolaren CDNB-Konzentrationen bei 2stündiger Inkubationsdauer ein stabile GSH-Senkung in der löslichen Fraktion (100.000xg) auf 10%. Aufgrund der Effizienz, mit der GSH gesenkt wurde, ist anzunehmen, daß CDNB in die Zelle penetriert.

Das fluorsubstituierte Analogon FDNB wurde zunächst im Diploenten D7 (GSH^+) geprüft.



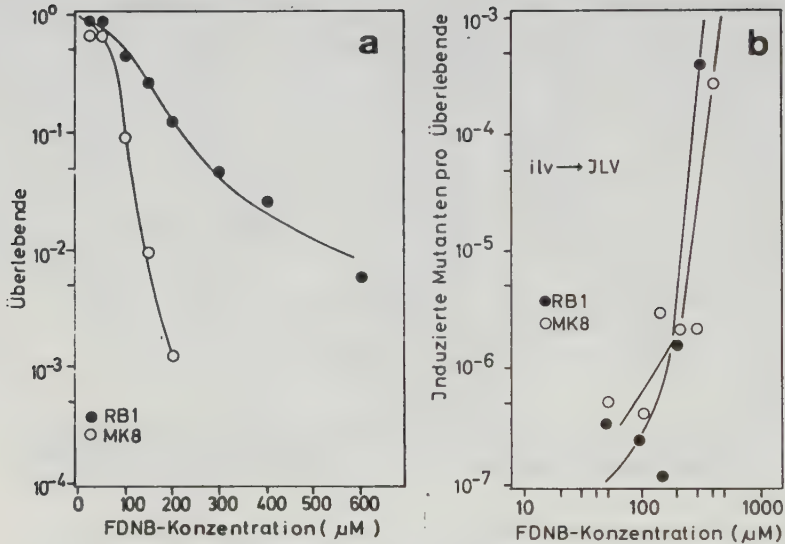
Figur 3.17a,b Überleben (a) sowie Mutagenität (Ilv) und Rekombinogenität (Trp) (b) von FDNB im GSH⁺ Diploclonten D7

Die Versuchspunkte sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Versuchen (+ SD bei Überlebenskurven). Bei den induzierten Werten in 3.17b ist der spontane Hintergrund abgezogen, der Fehler liegt zwischen Faktor 5-10 bei den hohen Induktionswerten.

FDNB zeigte in einem sehr engen Konzentrationsbereich starke mutagene und rekombinogene Wirkung. Die Ergebnisse sind mit den Daten von FAHRIG (1979) vergleichbar, der in anderen Hefestämmen mutagene und rekombinogene Wirkung festgestellt hatte.

Der mögliche Einfluß von GSH auf Überleben und Mutabilität bei FDNB-Behandlung sollte in vergleichenden Untersuchungen in GSH⁺ und gsh⁻ Haplonten abgeklärt werden.

Dafür wurden der GSH-Wildtypstamm RB1 und stellvertretend für die gsh⁻ Gruppe der Stamm MK8 (gsh1-1) gewählt.



Figur 3.18a,b Überleben (a) und Mutagenität (b) von *GSH*⁺ (RB1) und *gsh*⁻ (MK8) Haplonten nach FDNB-Behandlung (Mittelwert aus 4 unabhängigen Versuchen)

Die Streuung der Werte im niedrigen Konzentrationsbereich ist in 3.18b sehr groß (über ca. 1.5 Dekaden), auf eine Darstellung der Standardabweichungen muß deshalb verzichtet werden.

Wie erwartet, zeigten *gsh*⁻ Zellen erhöhte Letalität nach FDNB-Behandlung, was mit der erniedrigten Entgiftungskapazität durch GSH korreliert.

Überraschend allerdings war der Befund, daß sich die Mutationsinduktionskurven für Ilv, Trp und Ade (Trp und Ade nicht dargestellt) von *gsh*⁻ und *GSH*⁺ Zellen kaum unterschieden.

An den gefundenen Induktionskurven sind Zweifel angebracht, die folgenden Beobachtungen zugrunde liegen:

a) Abhängigkeiten der Mutationsinduktionskurven von der Dosis in der 6.-8. Potenz, wie sie in Figur 3.18b auftreten, werden für Induktionsprozesse nicht beobachtet.

b) Auf den synthetischen Mangelmedien waren dosisunabhängig immer etwa die gleiche Zahl an Rückmutanten zu beobachten. Mittels Überstempelungstechniken ließ sich zeigen, daß es sich tatsächlich um echte Revertanten und nicht um Restwuchsphänomene handelte. Dies spricht für eine Selektion resistenter Zellen.

Bei erhöhter Letalität und unverändertem $N_m(x)$ ergibt sich rechnerisch eine steile Mutationsinduktion, wenn man die Formel der Mutationshäufigkeit

$$M(x) = \frac{N_m(x)}{S}$$

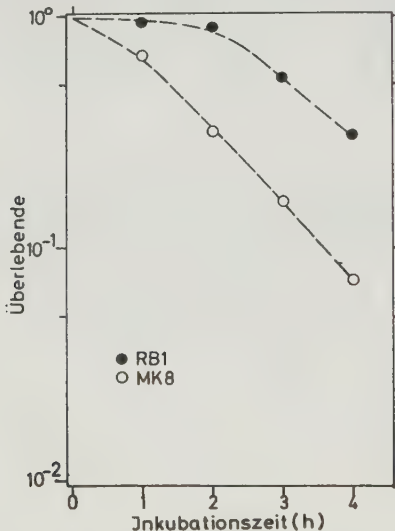
zugrunde legt.

c) Die Berechnung des Mutantenertrags ("mutant yield", $Y = M[x] \cdot S[x]$), der eine Aussage über die Zahl der induzierten Mutanten in der gesamten Population macht, gibt starke Hinweise auf einen Selektionsprozess. Im Falle einer Induktion lassen sich Yieldkurven als Glockenkurven mit einem Maximum beschreiben (Eckardt und Haynes, 1977). Im vorliegenden Fall war keine dosisabhängige Zunahme von Y zu beobachten (einige Yieldwerte besaßen sogar negative Vorzeichen).

Diese Befunde lassen vermuten, daß FDNB keine echte mutagene, sondern nur selektive Wirkung auf bestimmte Zellen besitzt.

Es kann ausgeschlossen werden, daß es sich hierbei um GSH⁺ Revertanten handelt, da eine Reihe von Einzelkolonien dieser vermutlich selektiv bevorteilten Zellen im MNNG-Hemmhoftest geprüft wurden.

Aus den bislang vorliegenden Ergebnissen war anzunehmen, daß der Knickpunkt im Überleben bestimmt wird durch die Äquimolarität der GSH-Konzentration der Zellsuspension und der FDNB-Konzentration, mit der diese Suspension behandelt wurde. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden FDNB-Konzentrationen (85 µM) eingesetzt, die nach 2 h Inkubation zu einem Letaltreffer pro Zelle (37% Überleben) in GSH⁺ Populationen führen, und beide Populationen (GSH⁺ und gsh⁻) über verschieden lange Zeiten inkubiert.



Figur 3.20 Zeitabhängige FDNB-Inkubation (85 µM) von GSH⁺ und gsh⁻ Haplonten

Die FDNB-Konzentration lag etwas über den errechneten GSH-Gehalten der GSH⁺ Haplonten (60 µM) im Inkubationsansatz, um die letale Wirkung von FDNB auch im GSH⁺ Stamm zu erfassen.

Im Vergleich zeigte der Wildtyp-Stamm RBl bei FDNB-Behandlung eine Schulterkurve, wohingegen in gsh⁻ Zellen diese Schulter nur angedeutet war. Dies spricht für eine effiziente FDNB-Konjugation durch GSH.

Die Resultate lassen sich interpretieren als die Fähigkeit der GSH⁺ Zellen, über einen längeren Zeitraum der toxischen Wirkung von FDNB durch GSH-Konjugation standzuhalten (cytosolischer Effekt). Die sich daran anschließende Kurvenneigung läuft nahezu parallel zu jener der gsh⁻ Mutante und weist (wie schon bei MNNG) auf analoge Prozesse in beiden Zellsystemen hin.

3.4.2. Bestrahlungsversuche mit ionisierenden Strahlen

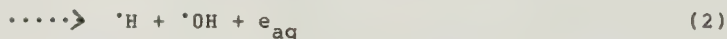
Ionisierende Strahlen setzen ein ganzes Spektrum von Schäden unterschiedlicher Natur an biologischen Makromolekülen. An der DNA entstehen Basenveränderungen, Einzelstrang- (ESB) und Doppelstrangbrüche (DSB), Schäden der sekundären Struktur, DNA-DNA-Vernetzungen oder DNA-Protein-Vernetzungen (z.B. KIEFER, 1981; DERTINGER und JUNG, 1969).

Die genannten DNA-Veränderungen sind entweder eine Folge von Ionisationen, die unmittelbar am Targetmolekül stattfinden (direkte Strahlenwirkung)



oder über sekundäre Reaktionen der durch die Bestrahlung des Wassers gebildeten Radiolyseprodukte (indirekte Strahlenwirkung). Die Radikale $\text{OH}^\cdot$ und $\text{H}^\cdot$ sowie das solvatisierte Elektron (e_{aq}^-) sind hier die entscheidenden Produkte.

$\text{H}_2\text{O} \dots\dots \rightarrow \cdot\text{H} + \cdot\text{OH}$ und durch die Folgereaktionen



Von den radikalischen Wasser-Radiolyseprodukten kommt dem $\cdot\text{OH}$ Radikal eine besondere Bedeutung zu; aufgrund seiner hohen chemischen Reaktivität reagiert es mit allen Biomolekülen in extrem schnellen Reaktionen, wobei in der Regel durch H-Abstraktion Alkylradikale $\cdot\text{RH}$ entstehen (mit den gleichen Eigenschaften wie durch direkte Strahlenwirkung (1) erzeugten).

Diese Alkylradikale reagieren in unterschiedlicher Weise weiter. Sie können einerseits durch weitere H-Abstraktionen Radikalstellen an anderen Molekülen erzeugen, oder andererseits durch Dimerisierungs- bzw. Disproportionierungsreaktionen zu stabilen Endprodukten, d.h. chemisch veränderten Biomolekülen abreagieren.

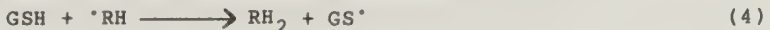
Im sauerstoffhaltigen, wäßrigen Zellmilieu stehen diese Reaktionen zudem in Konkurrenz zu den Reaktionen des Sauerstoffs, der wegen seiner biradikalischen Eigenschaften und der Häufigkeit seines Vorkommens effektiv an die organischen Radikale anlagert. Die gebildeten Peroxylradikale sind ihrerseits nicht stabil, sondern reagieren in komplexen Radikalkettenreaktionen weiter, bis die Kette z.B. mit der Ausbildung von stabilen Endprodukten wie Hydroperoxiden zum Stillstand kommt



Es wurde schon früh erkannt, daß die Folgen einer Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen allgemeinen Oxidationseffekten in der Zelle sehr ähnlich sind (GUZMANN-BARRON, 1951) und daß die Zelle über eine Anzahl von Schutzmechanismen verfügt, die sie gleichermaßen vor Bestrahlungseffekten wie vor "oxidativen Stress" schützen (AMES, 1983, 1984; MEISTER, 1983).

Substanzen mit freien Thiolgruppen, deren H-Atome leicht zur "Ausheilung" von Radikalstellen auf Biomolekülen übertragen werden können, kommen dafür in erster Linie in Betracht. In zahlreichen Arbeiten wurde nachgewiesen, daß Substanzen wie Cystein, Cystin, Cysteamin die Überlebenswahrscheinlichkeit von bestrahlten Zellen erhöhen und vor allem wurde Glutathion als ein wichtiger thiolhaltiger Schutzfaktor erkannt (BACQ und ALEXANDER, 1961).

Bei der Schutzwirkung durch Glutathion wird angenommen, daß sie über zwei verschiedene Mechanismen verläuft: einmal über die geschilderte H-Donation



die zum "ausgeheilten" Biomolekül und zu einem Thiyl-(GS $\cdot$ -)radikal führt (welches nach Dimerisierung zum Disulfid GSSG [z.B. TAMBA und QUINTILIANO, 1984] wieder enzymatisch reduziert werden kann); zum anderen gibt es Hinweise, daß GSH in nachgeschalteten Prozessen in die Ausheilung strahlenbedingter Schäden eingreift, z.B. in

Reparaturprozesse geschädigter DNA (DESCHAVANNE, et al., 1984; WELLNER et al., 1984) oder im Detoxifikationsmechanismus, z.B. durch Entgiftung von Peroxiden durch die GSH-Peroxidase (BIAGLOW et al., 1983b).

Besonders wichtige Aspekte ergeben sich aus den Vorstellungen, die in der sogenannten Sauerstoff-Fixierungshypothese ihren Niederschlag gefunden haben (HOWARD-FLANDERS, 1958).

Demnach läuft die Restitution ("Ausheilung") einer Schadensstelle durch Abfangen der Radikale (scavenging) nach Gleichung (4) in Konkurrenz ab zu einer "Fixierung" durch Sauerstoff nach Gleichung (3); d.h. die Radikalstelle wird durch die Anlagerung von Sauerstoff der Ausheilung durch H-Donation entzogen. Da die Reaktionskonstanten für die O_2 -Addition um Größenordnungen höher sind als für die H-Donation, könnte unter den normalen intrazellulären Konzentrationsbedingungen die Sauerstoffreaktion dominieren und der Schutzeffekt von GSH unter Bestrahlung würde praktisch vernachlässigbar (ALPER und HOWARD-FLANDERS, 1956; HOWARD-FLANDERS, 1958; HOWARD-FLANDERS und MOORE, 1958).

Legt man diese Modellvorstellung zugrunde, sollten sich eigentlich bei Bestrahlung unter Sauerstoffbedingungen zwischen GSH^+ und gsh^- Zellen keine Unterschiede im Überleben zeigen. Tatsächlich ist dies von einer Reihe von Experimentatoren, die allerdings zumeist mit chemischen GSH-Depletoren gearbeitet haben, in einigen Zellsystemen gefunden worden (z.B. HARRIS, 1983; WARD, 1983). Es gibt jedoch auch widersprüchliche Ergebnisse (CHAPMAN et al., 1973; BIAGLOW et al., 1983a; HARRIS, 1983; KIMLER et al., 1977; VOS et al., 1976). Entsprechend dieser Vorstellung sollten unter N_2 Bedingungen der Restitutions- und/oder Scavenging-Effekt von GSH allerdings deutlich hervortreten, d.h. GSH^+ Zellen strahlenresistenter sein als gsh^- Zellen.

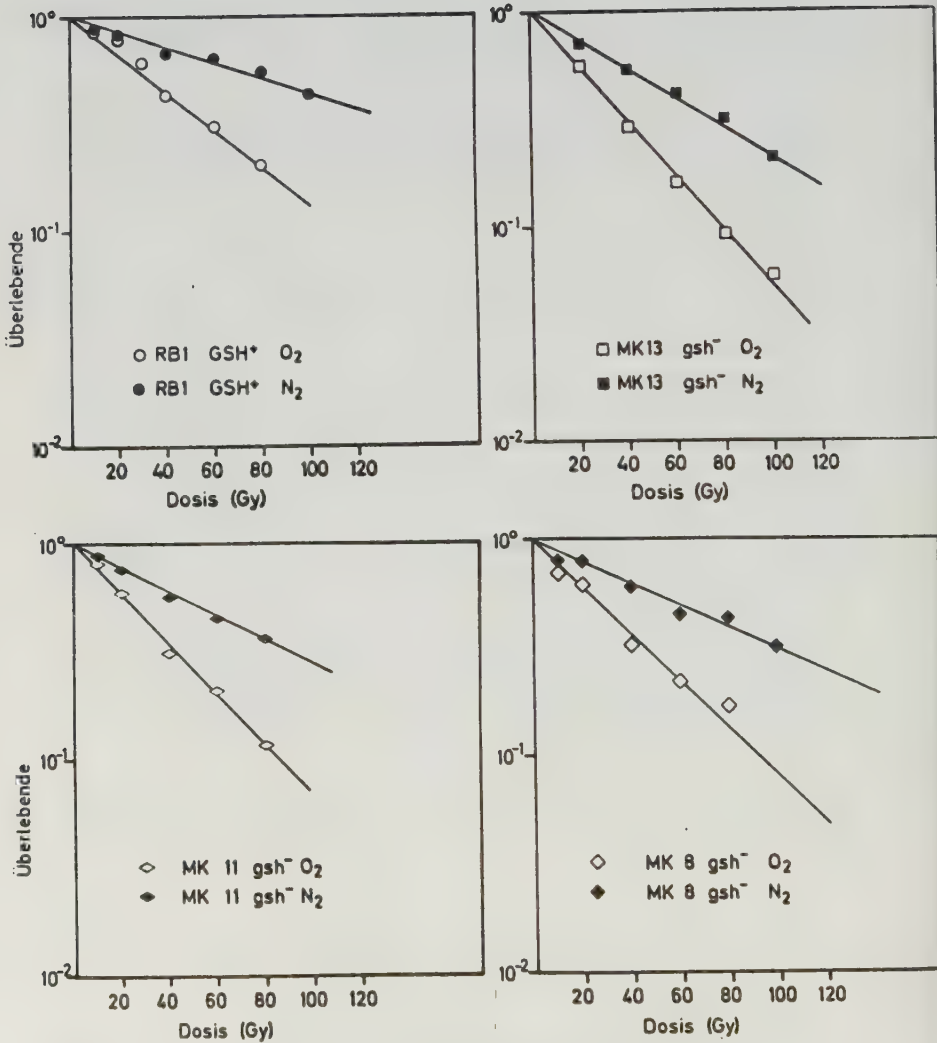
Die Rolle von GSH als Schutzsubstanz sollte mit GSH-defizienten und GSH-profizienten Hefen (Diplonten und Haplonten) bei Bestrahlung mit ionisierender Strahlung und unter verschiedenen Gasbedingungen (Luft mit normalen O_2 -Partialdruck oder N_2) unter Berücksichtigung folgender Überlegungen experimentell überprüft werden:

1. Sind die Versuchsergebnisse mit gsh⁻ Mutanten mit einem stabil niedrigen GSH-Spiegel verschieden, wenn man die Überlebensraten der Zellen unter O_2 bzw. N_2 Bedingungen vergleicht?
2. Verhalten sich Haplonten und Diplonten bei diesen Bedingungen gleich?

In Hefe besteht die Möglichkeit, die Induktion von DSB von deren Reparatur in einfacher Weise zu trennen. Haploide Hefezellen im nicht-replizierenden Zustand (G1/G0-Phase) sind nicht in der Lage, DSB zu reparieren, weil dies die Anwesenheit zweier homologer DNA-Duplizies für die Rekombinationsreparatur voraussetzt (LUCHNIK et al., 1977). Diplonten dagegen sind in der Lage, unter Nichtwuchsbedingungen aufgrund des doppelten Genomsatzes DSB-Reparatur durchzuführen (RESNICK, 1976; RESNICK und MARTIN, 1976; FRANKENBERG und FRANKENBERG-SCHWAGER, 1981; FRANKENBERG-SCHWAGER et al., 1980a,b; FRANKENBERG et al., 1984).

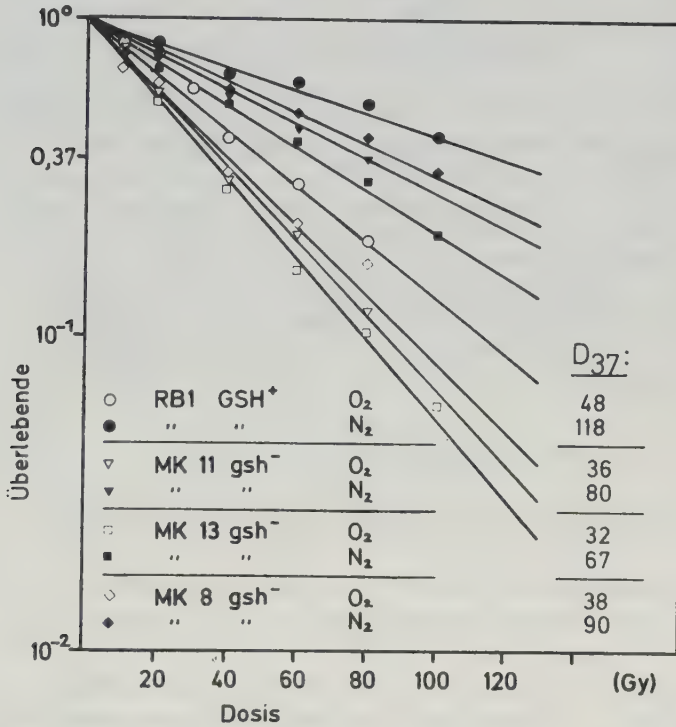
Diese Versuche sind in den Figuren 3.21 und 3.22 zusammengefaßt.

3.4.2.1. Bestrahlungsversuche mit Haplonten



Figur 3.21a-d Überleben von stationären GSH^+ und gsh^- Haplonten nach Bestrahlung unter aeroben und anoxischen Bedingungen mit 30 MeV Elektronen

In Abbildung 3.22 sind die Kurven aus den Figuren 3.21a-d zusammengefaßt, um die Effekte von O_2 und N_2 auf GSH-depletierte und Wildtypzellen zu verdeutlichen.



Figur 3.22 Zusammenfassung der Einzelabbildungen aus Figur 3.21a-d mit D_{37} -Werten (Dosisäquivalent für einen Letaltreffer)

Aus den ermittelten D_0 Werten (siehe nachfolgend) ließ sich errechnen, daß die Unterschiede in der Strahlensensibilität zwischen O_2 und N_2 Bestrahlung in GSH^+ Zellen größer sind als in gsh^- Zellen.

Dies drückt sich auch in unterschiedlichen OER-Werten aus:

STAMM	GSH-Gehalt	OER
RB1	100%	2,5
MK 8	7%	2,2
MK11	2%	2,0
MK13	2%	2,0

Tabelle 3.18 OER-Gehalte in GSH^+ und gsh^- Zellen nach γ -Bestrahlung mit 30 MeV Elektronen

Die OER-Werte ("oxygen enhancement ratio"; Sauerstoff-Verstärkungsverhältnis) wurden ermittelt nach Berechnung der D_0 -Werte jedes Stammes unter oxischen und anoxischen Bedingungen. D_0 ist hierbei definiert als die Dosis, welche zur Reduktion des Überlebens im linearen Teil um $1/e$ führt. Da Haplonten keine Schulter aufweisen, ist D_0 gleich D_{37} (Figur 3.22). Der OER berechnet sich aus dem Verhältnis der Dosen, die in An- bzw. Abwesenheit von O_2 den identischen Effekt ergeben:

$$\text{OER} = \left(\frac{D_0(-O_2)}{D_0(+O_2)} \right)$$

Die aus jeweils vier Einzelexperimenten erhaltenen Werte wurden über eine Regressionsanalyse ermittelt.

Aus den Resultaten der Figuren 3.21 und 3.22 sowie der Tabelle 3.18 können folgende Schlüsse gezogen werden:

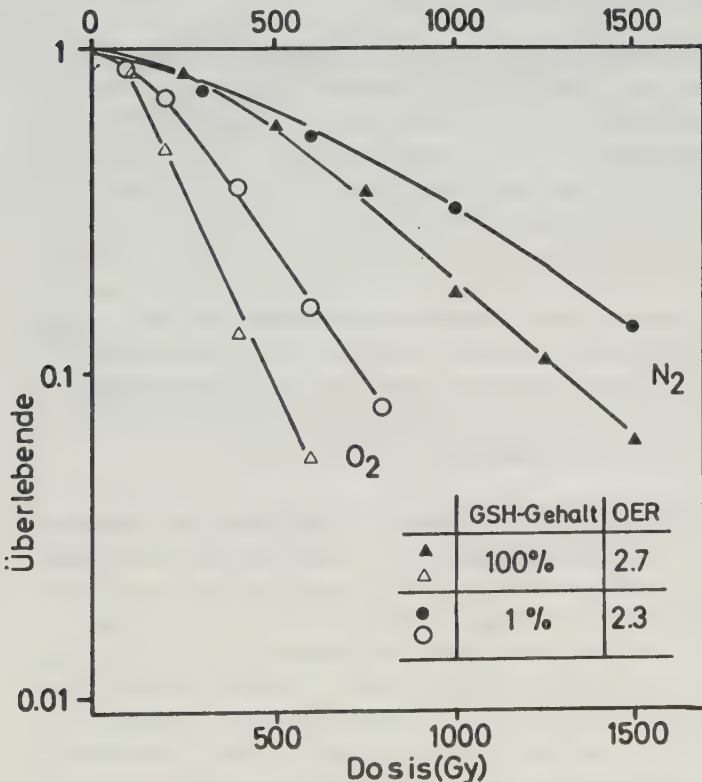
1. Die D_0 -Werte von GSH^+ und gsh^- Zellen weichen unter anoxischen Bestrahlungsbedingungen stark voneinander ab, was auf einen primären Einfluß von GSH bei der Verhinderung von DNA-Schäden hinweist. Jedoch auch unter Aerobiosis finden sich Unterschiede im Überleben zwischen den GSH-depletierten Zellen und dem Wildtyp, was ebenfalls für eine Schutzfunktion von GSH bei der Induktion von potentiell letalen Schäden (potentiell lethal lesions /PLL) unter O_2 Bedingungen spricht.

Dieses Resultat steht im Gegensatz zu dem HOWARD-FLANDERS-"Modell" (HOWARD-FLANDERS, 1958), nach dem GSH unter O_2 Bedingungen keine Protektorfunktion übernimmt.

2. Der GSH-Gehalt in den Zellen von Saccharomyces cerevisiae übt auf den OER nur eine geringe Wirkung aus, d.h. der natürliche GSH-Gehalt schützt die Zellen gegenüber der Induktion von PLL nur in geringem Maße.

3.4.2.2. Bestrahlungsversuche mit Diplonten

Neben dem Einsatz von stationären Haplonten, in denen die Effekte der DSB-Induktion allein gemessen wurden, dienten Diplonten zur Untersuchung der gemeinsam auftretenden Effekte von DSB-Induktion und DSB-Reparatur.



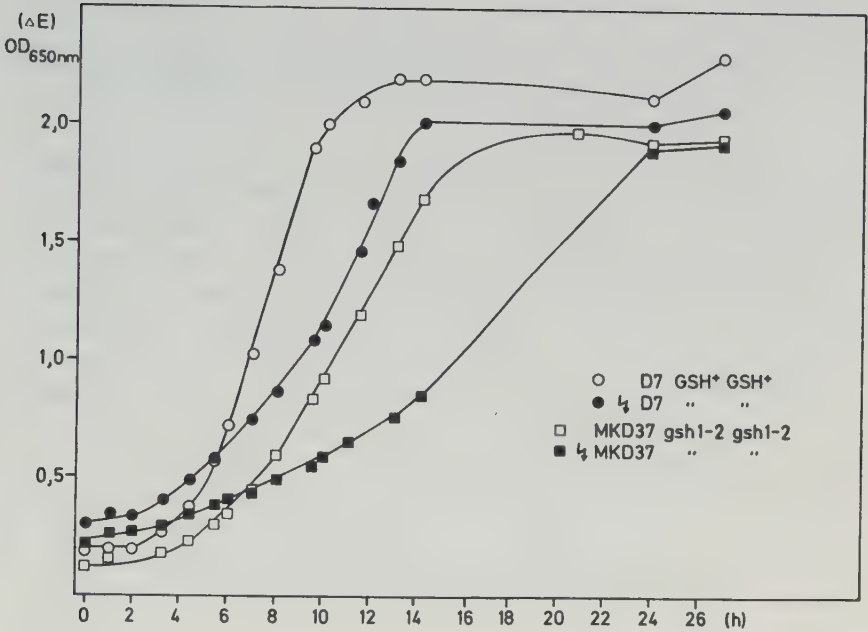
Figur 3.23 Überleben γ -bestrahlter gsh^- Diplonten (gsh1-5 gsh1-5) im Vergleich zu GSH^+ Diplonten (D7)

Die Punkte entstanden aus einer Regressionsanalyse von vier Einzelexperimenten.

Für die Bestrahlung diploider Zellen wurden der WT-Diplont (D7) und zwei gsh^- Diplonten mit 1% ($gshl-5$ $gshl-5$) bzw. 7% ($gshl-1$ $gshl-1$) Rest-GSH eingesetzt. Da für beide Mutanten nahezu die gleichen Kurven zu beobachten waren, wird in der Figur 3.23 stellvertretend nur eine Mutante gezeigt. Überraschenderweise zeigten die gsh^- Mutanten besseres Überleben als Wildtypzellen sowohl unter O_2 als auch unter N_2 . Eine mögliche Interpretation der Kurven ist, daß im Vergleich zu GSH^+ Zellen in gsh^- Zellen eine größere Fraktion von DSB repariert wurde. Es wurden deshalb Wuchskurven bestrahlter und unbestrahlter GSH^+ und gsh^- Stämme aufgenommen (Figur 3.24).

Unbestrahlte GSH^+ und gsh^- Diplonten zeigten nahezu identische lag-Phasen. gsh^- Diplonten hatten also nicht per se Wuchsnachteile oder phänotypische Beeinträchtigungen (siehe auch Punkt 3.3.7.). Bestrahlte GSH^+ Zellen waren in ihrer lag-Phase kaum verzögert, wiesen aber einen deutlichen biphasischen Verlauf im exponentiellen Bereich auf. Der anfänglich flache Verlauf der Kurve deutet auf einen Block im Zellzyklus eines Teils der überlebenden Population hin. Die Zellen hätten also möglicherweise in dieser Zeit die (präletalen) induzierten DSB reparieren und nach abgeschlossener Reparatur (ca. 9 h) wieder in den Zellzyklus einlaufen können. Der Anteil sich teilender Zellen wäre dann spätestens zu diesem Zeitpunkt wieder 100% gewesen.

In der gsh^- Population ging nach Bestrahlung die lag-Phase in eine sehr flache exponentielle Kurve über. Unter der Annahme eines Zellzyklusblocks wäre daraus zu schließen, daß die Zahl der PLL in der gsh^- Population größer sein mußte als im D7, mit der Folge eines verzögerten Eintritts in den Zellteilungszyklus. Die Dauer dieser flachen Kurve war mit 14 h wesentlich länger als im bestrahlten GSH^+ Wildtyp, d.h. die im Zellzyklus blockierten Zellen hatten demgemäß mehr Zeit zur Reparatur der DNA-Schäden als die Wildtypzellen, um eine letale Fixierung zu vermeiden.



Figur 3.26 Wuchskurven unbestrahlter und bestrahlter GSH⁺ und gsh⁻ Diplonten

Die Bestrahlung wurde mit 30 MeV Elektronen unter O₂-gesättigten Bedingungen durchgeführt. Die bestrahlte Ausgangssuspension wurde so eingestellt, daß die überlebende Fraktion dem Anfangstitier der Kontrollpopulation entsprach.

Auch bei Bestrahlung unter Anaerobiosis (N₂) konnten die gleichen Veränderungen der Wuchskurven in gsh⁻ Diplonten beobachtet werden wie unter aeroben Bedingungen.

4. Diskussion

4.1. Charakterisierung von gsh⁻ Mutanten aus Saccharomyces cerevisiae

GSH ist für den zellulären Stoffwechsel von großer Bedeutung. Ca. 20 metabolische Funktionen sind bislang beschrieben (MITCHELL und RUSSO, 1983). Um näheren Einblick in die vielfältigen Funktionen zu bekommen, sind Untersuchungen an Zellen mit verändertem GSH-Gehalt eine Möglichkeit, Kenntnisse darüber zu erhalten. Sowohl zellphysiologische Veränderungen als auch Veränderungen der Metabolisierung endogen und exogen erzeugter toxischer Metabolite können dabei untersucht werden.

Prinzipiell kann der GSH-Gehalt chemisch und genetisch manipuliert werden. Zum Studium GSH-abhängiger Prozesse kann der Einsatz chemischer Agentien (wie z.B. Diamid, N-Ethylmaleimid, Diethylmaleat) verschiedene Nachteile haben, wie pleiotrope Seiteneffekte, kurze Halbwertszeit und Stimulierung der GSH-Resynthese (HARRIS, 1983; MEISTER, 1984; REED, 1986). Deshalb erschien die Suche nach Mutanten mit einem Defekt in der GSH-Synthese ein erfolgversprechender Weg zu sein, diese Probleme zu umgehen.

Als Studienobjekt für die vorliegende Arbeit wurde die Hefe Saccharomyces cerevisiae gewählt, da sie einen leicht zu handhabenden und ökonomisch einsetzbaren Organismus mit gut bekannter Genetik und Molekularbiologie darstellt. Durch ihre eukaryontische zelluläre Organisation kann sie als Modellorganismus für höhere Zellsysteme dienen.

Fünf voneinander unabhängig isolierte Hefestämme zeigen genetisch bedingte GSH-Depletion, die zu Restgehalten von 1-5% GSH führen. Diese Zellen sind beeinträchtigt im Wachstum, in der Atmung, in der Knospung und der sexuellen Reproduktion.

Auch nach mehrmaligen Einkreuzen in einen GSH⁺ Wildtypstamm, wodurch etwaige durch MNNG-induzierte Zweitmutationen heraussegregieren sollten, bleiben diese für gsh⁻ Mutanten charakteristischen Merkmale erhalten. Sie sind damit in einem kausalen Zusammenhang mit der GSH-Depletion und als deren pleiotropen zellphysiologischen Effekte anzusehen.

Eine genetische Analyse der Mutanten belegt für alle eine monogene, rezessive Vererbung. Sie komplementieren nicht, was wahrscheinlich macht, daß alle ein einziges Gen betreffen. Sie erhielten daher die Allelbezeichnung gsh1-1 bis gsh1-5. Dieser Befund ist überraschend, wenn man berücksichtigt, daß zur GSH-Biosynthese zwei Enzyme (γ -GCS und GSH-Synthetase) notwendig sind und daß bei der Annahme von 2 die GSH-Synthese kontrollierenden Genen mit nur 6,25% Wahrscheinlichkeit alle 5 unabhängig isolierten Mutanten dasselbe Gen betreffen¹⁾.

Der sehr niedrige GSH-Spiegel in gsh⁻ Zellen wird durch Zufütterung der GSH-Vorstufen nicht erhöht. Auch das Wachstumsverhalten wird dadurch nicht beeinflusst. Die de-novo Synthese der Bausteine des GSH scheint also durch die gsh⁻ Mutation nicht beeinträchtigt zu sein. Die fehlende GSH-Rekonstitution durch SH-(Cystein, Cystin, N-Acetylcystein-) Zufütterung steht im Widerspruch zu Ergebnissen aus

-
- 1) Der Befund einer Nicht-Komplementation aller fünf gsh⁻ Mutanten läßt sich mathematisch folgendermaßen betrachten:
Nimmt man 2 multiple Loci (Gene der GSH-Biosynthese) mit
a) gleicher Mutationshäufigkeit und
b) gleicher Wahrscheinlichkeit im Überleben, Trans-mission etc,
so ist die Wahrscheinlichkeit für 5 Mutationen, die alle im gleichen Locus zu finden sind, nach dem Binomialansatz

$$2 \times \left(\frac{N!}{k!(N-k)!} \right) \times (p)^k \times (1-p)^{1-k} = 0.0625$$

$$2 \times \left(\frac{5!}{5! \times 0!} \right) \times \left(\frac{1}{2} \right)^5 \times \left(1 - \frac{1}{2} \right)^0 = 0.0625 ,$$

wobei die Anzahl der möglichen (N) gleich der Anzahl der tatsächlich aufgetretenen (k) Mutationen ist (bei einer à priori-Wahrscheinlichkeit für beide Gene von $p = 1/2$).

Versuchen mit gshA-Mutanten (Defekt in der γ -GCS) aus Salmonella typhimurium, in denen durch selektive Cystein-Zufütterung der GSH-Gehalt partiell erhöht werden konnte (KERKLAAN, 1984 und 1985).

Alle essentiellen Aminosäuren, insbesondere das schwefelhaltige Methionin, werden in Wildtyp und gsh⁻ Stämmen gut aufgenommen.

Dies schließt eine Mutation aus, die die generelle Aminosäureaufnahme (GAP) und spezifische Aminosäure-Carrier betrifft. Zufütterung von GSH beeinflusste den intrazellulären GSH-Spiegel nicht. Dies erlaubt den Schluß, daß GSH in der reduzierten Form von Hefezellen nicht aufgenommen wird, sondern nur in Form seiner Präkursoren-Bestandteile. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Säugerzell-Linien (DETHMERS und MEISTER, 1981; MEISTER und ANDERSON, 1983).

Die biochemische Untersuchung der Mutanten macht einen Defekt in der GSH-Biosynthese wahrscheinlich, da die Aktivität der γ -GCS, für deren Bestimmung ein neuer Test entwickelt wurde, in allen Stämmen erheblich (auf 3,0, 3,6, 4,8 und 6,5% bei den Stämmen MK13, MK11, MK37 und MK8) reduziert ist.

Zusätzlich ist in den Stämmen MK8 und MK37 die Aktivität der GSH-Synthetase (auf 69 bzw. 25% der des Wildtyps) gesenkt. Zwei unabhängige Mutationen in jedem der beiden Synthesegene ist als Ursache unwahrscheinlich. Außerdem ist die Aktivitätsverringering im zweiten Schritt bei weitem nicht so stark wie die im ersten, so daß dies zu keiner erkennbaren biologischen Relevanz führt. Da der erste Schritt der Biosynthese als der geschwindigkeitsbestimmende angesehen wird, sollte die vergleichsweise geringe Aktivitätsverringering im zweiten Schritt demnach auch keine großen Auswirkungen erwarten lassen.

Die über MNNG-Resistenz selektionierten gsh⁻ Stämme brachten, wie erwähnt, nur Mutanten eines Typs (Defekt in der γ -GCS) hervor. Dabei erhebt sich die Frage, ob es sich hierbei um ein methodisches Problem handelt. So könnten Mutanten mit einem Defekt in der GSH-Synthetase in der Isolationsprozedur mittels Hemmhof nicht erkannt werden, weil sie durch Anhäufung des Dipeptids γ -Glu-Cys (mit freier SH-Gruppe) bereits in der Lage wären, MNNG zu metabolisieren. Ein solcher Mutantentyp würde sich im Hemmhof ähnlich wie der Wildtyp verhalten, zumindest wäre er weniger resistent als eine Defektmutante im ersten Schritt.

Es gibt Hinweise, daß eine durch einen Defekt in der GSH-Synthetase bedingte GSH-Defizienz, wie sie im Gegensatz zu den vorliegenden Hefemutanten in den meisten GSH-defekten Zellen bzw. Zell-Linien von Humanzellen auftritt, weniger Konsequenzen (z.B. nach Bestrahlung) für die Zelle hat als ein Defekt in der γ -GCS (EDGREN et al., 1981). Dies wird von den Autoren auf die Anhäufung des Dipeptids γ -Glu-Cys aus dem ersten Syntheseschritt zurückgeführt, welches zumindest partiell die Funktion von GSH übernehmen könnte. Dadurch, daß der Defekt in Hefe im ersten Schritt identifiziert wurde, war eine solche Anhäufung nicht zu erwarten und in der Tat ist in den Mutanten das Rest-GSH nahezu identisch mit dem Nicht-Protein-Thiol (NPSH).

Dies bedeutet, daß es möglicherweise günstiger wäre, GSH-depletierte Zellen mit einem Defekt im ersten Syntheseschritt statt im zweiten für Untersuchungen GSH-gebundener Funktionen einzusetzen, um pleiotrope Effekte erhöhter NPSH's durch Anhäufung des Dipeptids ausschließen zu können. Solche Mutanten aus anderen Eukaryonten und insbesondere aus Humanzellen sind jedoch unzureichend beschrieben. Detaillierte Untersuchungen liegen in keinem Fall vor (MEISTER, 1982).

Es wäre ohne Frage interessant, auch Hefemutanten mit einem Defekt im zweiten Syntheseschritt zu isolieren (evtl. mit anderen Methoden, z.B. mittels Nitroprussid-Anfärbung nach Mutagenisierung mit UV statt Selektion mit chemischen Agentien). Aufgrund der Möglichkeiten genetischer Analysen in Hefe könnten Mutanten mit genetisch fixierten Defekten in beiden Syntheseschritten systematisch untersucht werden (Komplementation, Konstruktion von Doppelmutanten etc.). Dies ist in höheren Zellsystemen in dieser Form nicht möglich. APONTOWEIL und BERENDS (1975a/b) gelang die Isolation von bakteriellen Defektmutanten im ersten und zweiten Syntheseschritt. Genetische Daten allerdings liegen auch hier nicht vor.

Betrachtet man die Aktivitätsverringerungen von γ -GCS und GSH-Synthetase in den Mutanten MK8 und MK37, so könnte angenommen werden, daß beide Synthesenzyme nicht unabhängig voneinander sind. Man könnte einen Enzymkomplex für beide Enzyme postulieren, bei dem durch eine Mutation im Gen für γ -GCS eine Konformationsänderung des Proteins auftritt, die auch die Tertiärstruktur des zweiten Enzyms im Komplex beeinflussen kann. Es ließe sich aber auch annehmen, daß nur ein Gen für ein Enzym mit zwei katalytischen Zentren kodiert und spezifische Mutationen (Rasterschub, Unsinn) beide Enzymdomänen beeinflussen. Denkbar wäre schließlich auch eine Mutation in einem Gen, das für eine identische Untereinheit in beiden Enzymen kodiert. Im vorliegenden Fall würde jedes Mutantenallel (gsh1-1 bis gsh1-5) zum Defekt in der γ -GCS führen, wohingegen die Allele gsh1-1 (MK8) und gsh1-2 (MK37) zusätzlich einen Defekt in der GSH-Synthetase verursachen würden. Als weitere Möglichkeit läßt sich nicht ausschließen, daß ein Fall von differentiellen Spleißen vorliegt wie bei β -Thalassämie (Knippers, 1985).

Der Befund, daß Buthionin-Sulfoximin (BSO) als spezifischer Inhibitor der γ -GCS (MEISTER, 1984) auch die Hefe-GSH-Synthetase in vitro beeinflusst (M. ELSKENS, pers. Mitteilung), stützt die Vermutung einer möglichen Abhängigkeit beider Enzyme.

Andererseits kann aus diesem Befund keines der vorgestellten Modelle favorisiert werden.

Bislang gab es in Hefe keinerlei Untersuchungen über den Einfluß genetisch bedingter GSH-Defizienz auf den γ -Glutamylzyklus. Die von MOOZ (1979) als GSH-defizient beschriebene gap-Mutante (GRENSON, 1970) von Saccharomyces cerevisiae, die sie als Modelleukaryont zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen fehlendem Aminosäuretransport und dem γ -Glutamylzyklus vorschlug, erwies sich in den Händen anderer Experimentatoren (JASPERS und PENNINCKX, 1981) weder in der GSH-Synthetase defekt noch im GSH-Gehalt gesenkt. Deshalb sind die in dieser Arbeit vorgestellten gsh⁻ Mutanten bislang die ersten Hefen, die als Modelleukaryonten zur Untersuchung γ -Glutamylzyklus-abhängiger Prozesse eingesetzt werden könnten.

Die Untersuchung des Einflusses der GSH-Defizienz auf die γ -GTP ist deshalb von Interesse, weil die Funktion des Enzyms in Hefe noch immer kontrovers diskutiert wird, speziell im Hinblick auf ihre Rolle in der Aminosäureaufnahme (einschließlich der GSH-Vorstufen) (OSUJI, 1980; PAYNE und PAYNE, 1984; PENNINCKX et al., 1980; ROBINS und DAVIES, 1980, 1981). Während ihre Beteiligung in der GSH-Hydrolyse als gesichert gilt, ist ihre Transferaseaktivität bislang nur in vitro beschrieben worden (JASPERS et al., 1985).

Bei den durchgeführten Messungen wurden stammabhängige Unterschiede in den Aktivitäten des zum γ -Glutamylzyklus zugehörigen Enzyms γ -GTP bestimmt. Die unterschiedliche Verringerung der γ -GTP in vier von fünf gsh⁻ Stämmen unterstützen nicht die Vorstellung einer zentralen Rolle im Aminosäuretransport, da andererseits in allen gsh⁻ Stämmen die GSH-Vorstufen dem Wildtyp vergleichbar aufgenommen werden.

Außerdem sind auch die Aktivitäten der GR und der GSH-S-Transferasen verändert. Die Ursachen dieser geänderten Enzymaktivitäten sind derzeit nicht bekannt: verschiedene Mutationen in dem Gen, das für die γ -GCS kodiert, bewirken pleiotrope Änderungen in den Aktivitäten anderer dem γ -Glutamylzyklus oder dem GSH-Metabolismus zugehörigen Enzymen.

In diesem Zusammenhang ist jedoch auffällig, daß nur Mutanten mit weniger als 5% GSH-Restgehalt (MK11, MK13, MK42) in all diesen Enzymaktivitäten (γ -GTP, GR und GSH-S-Transferasen) reduziert sind. Dies ließe sich erklären mit einer Verringerung der intrazellulären Enzymkonzentration (im Sinne einer Stoffwechseladaptation) als Folge einer kritischen intrazellulären Verringerung von Substrat (Glutathion). Dieser für die Zelle kritische GSH-Gehalt ist wahrscheinlich auch die Ursache für die auffälligen Eigenheiten im Phänotyp dieser Stämme.

Auch in Säugerzellen, deren GSH-Gehalte bis auf ca. 7% gesenkt waren, wurden starke phänotypische Veränderungen (geringe Plattierungseffizienz, schlechter Wuchs etc.) beobachtet. Es wurde vermutet, daß derart niedrige GSH-Gehalte zu Beeinträchtigungen der GR, der GSH-Peroxidase und des Desoxy nukleotidgehalts in diesen Zell-Linien führen (ASTOR, 1984). Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren tatsächlich solche Beeinflussungen von Enzymen des GSH-Metabolismus in Eukaryonten.

Auch wurde beobachtet, daß gerade die Hefestämme mit sehr geringem GSH-Gehalt diesen häufig auf ca. 15-20% Rest-GSH (metabolisch?) supprimieren, was offenbar ausreicht, den GSH⁺ Phänotyp wiederherzustellen. In den supprimierten Stämmen (gsh⁻ SUP) werden die GSH-Vorstufen verstärkt aufgenommen. Auch die Aktivität der γ -GTP ist bis um Faktor 3 erhöht (M. ELSKENS, pers. Mitteilung). Ob hier ein Zusammenhang besteht, kann nicht beantwortet werden.

Ganz im Gegensatz zu Haplonten zeigen gsh⁻ Diplonten trotz starker GSH-Depletion (ca. 3% Rest-GSH) keinerlei Einschränkungen in ihren Wachstumseigenschaften. Ihr GSH- bzw. NPSH-Gehalt ist verringert. Da jedoch der PSH-Gehalt mit dem Wildtypstamm vergleichbar ist, läßt sich das Wachstum vielleicht besser mit PSH als mit GSH korrelieren.

Wenn diese Ergebnisse (für diploide Eukaryonten) zu generalisieren sind, haben sie möglicherweise große Bedeutung in der Beurteilung von z.T. widersprüchlichen Resultaten, die die protektive Rolle von GSH beschreiben. Offenbar ist die Kenntnis über den Gehalt des PSH in den jeweiligen Untersuchungsobjekten wichtig, um die Rolle des GSH richtig einzuschätzen.

Die Ergebnisse aus den biochemischen Bestimmungen könnten insofern auch von genereller Bedeutung sein, als die in gsh⁻ Zellen höherer Eukaryonten (bei 12 beschriebenen erblich fixierten GSH-Defekten) gemessenen GSH-Gehalte i.a. zwischen 15-20% (evtl. supprimiert?) liegen (DESCHAVANNE et al., 1984; REVESZ, 1983). Nur einige liegen darunter (25% Rest-GSH); solche Zellen sind in Zellkulturversuchen jedoch nur schlecht zu handhaben und weisen eine stark verminderte Plattierungseffizienz (ca. 3-5%; MALAISE, 1983) auf.

In den meisten Versuchen über den GSH-abhängigen Metabolismus in Eukaryonten wurde der GSH-Gehalt mit chemischen Depletoren gesenkt. Wie mit CDNB und Chloracetophenon gezeigt werden konnte, läßt sich auch in Hefe der GSH-Gehalt vergleichbar effizient, jedoch nur kurzfristig, chemisch senken.

Hefezellen mit unterschiedlichen GSH-Gehalt können jedoch auch noch auf andere Weise erhalten werden.

So konnte gezeigt werden, daß sich der GSH-Spiegel im Verlaufe des Wachstums ändert: In exponentiellen Kulturen ist er relativ niedrig (ca. 250 nmol/10⁹ N). Er steigt in später Wachstumsphase (oszillierend) an und erreicht den

höchsten (stabilen) Wert in stationären Kulturen ($1.000-1200 \text{ nmol}/10^9 \text{ N}$). Dies steht im Gegensatz zu Säugerzellen, in denen die GSH-Gehalte in exponentiellen Zellen vergleichbar hoch sind und dann in der Plateauphase abfallen (MALAISE, 1983).

Der GSH-Gehalt läßt sich auch durch unterschiedliche Anzuchtbedingungen manipulieren. Wuchs auf Medien mit nicht-vergärbaren Kohlenstoffquellen (Ethanol, Glyzerin) zögern die GSH-Akkumulation in der frühen stationären Phase hinaus, während hohe Glukosekonzentrationen ("Glukoserepression") die GSH-Akkumulation völlig verhindern. Diese Versuche wurden in normalen Schüttelkulturen und in kontrollierten Fermentationen durchgeführt.

In kontinuierlichen Fermentationen, deren Resultate hier nicht im einzelnen dargestellt werden, konnte eine wachstumsgekoppelte Abhängigkeit der GSH-Produktion von der spezifischen Wachstumsrate μ festgestellt werden, was bedeutet, daß die Produktionsrate mit der Zellteilungsrate anwächst. Da jedoch GSH offensichtlich verstärkt in den Stoffwechsel einfließt, ist der nachweisbare freie GSH-Gehalt in exponentiell wachsenden Kulturen geringer. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von FAHEY und Mitarbeitern (1974), die eine verstärkte Einbindung von GSH (als gemischte Disulfide) in log-Phase Zellen von Neurospora crassa beobachten konnten. Die Autoren generalisieren, daß GSH verstärkt in den Teilungsstoffwechsel schnell wachsender Systeme eingebracht wird. Dies könnte andererseits erklären, warum die GSH-Gehalte vergleichsweise langsam wachsender Zellen bzw. Zellverbände (z.B. menschlicher Zell-Linien) in exponentieller Wachstumsphase nicht geringer sind als in stationärer.

4.2. Untersuchungen über die Schutzwirkung von GSH mit chemischen Substanzen und ionisierenden Strahlen

4.2.1. Fremdstoffmetabolismus

Viele Untersuchungen über Metabolisierung von Xenobiotika wurden in Säugerzellen (Ganztier, Organen und Zell-Linien) angestellt, jedoch nur wenige etablierte und zumeist aufwendige Tests existieren zur Erfassung genotoxischer Aktivität in diesen Systemen (BRUSICK, 1980; VENITT und PARRY, 1984). In Hefe und anderen mikrobiellen Testsystemen (z.B. "Ames"-Test mit Salmonella typhimurium) ist dies jedoch möglich. Aber auch hier gibt es kaum Untersuchungen über die Wechselwirkung cytoplasmatischer Metabolisierung einer Substanz und ihrer genotoxischen Wirksamkeit, wenn man von einigen Untersuchungen über die mutagene Wirkung von Substanzen und ihrer Cytochrom P-450-abhängigen Aktivierung in der Hefe absieht (CALLEN und PHILPOT 1977; BARALE et al., 1983; KELLY et al., 1985).

GSH stellt die wichtigste Komponente im zellulären Entgiftungsprozess von Fremdstoffen dar, und dies offenbar auch in Hefe. Der GSH-Gehalt in Hefe wurde in den hier beschriebenen Experimenten in unterschiedlicher Weise beeinflusst, was Voraussetzung für einige Untersuchungen zur GSH-abhängigen Fremdstoffmetabolisierung war.

Die Untersuchungen über die Rolle von GSH in Hefe bei der Fremdstoffmetabolisierung wurden mit Substanzen angestellt, die über GSH vermutlich in vivo aktiviert oder inaktiviert werden: Die Nitrosoguanidine (NG) MNNG und ENNG als Vertreter der GSH-aktivierbaren Substanzen sowie die halogenierten Nitroaromaten CDNB und FDNB als Vertreter der inaktivierbaren Substanzen. Aktivierung wird hier definiert als eine durch GSH vermittelte Metabolisierung einer Substanz, wobei der Metabolit höhere toxische Eigenschaften besitzt als dessen Ausgangssubstanz.

Bei den NG-Verbindungen liegt allerdings ein Sonderfall der Aktivierung vor: weder MNNG noch ENNG werden durch GSH konjugiert, sondern schwefelkatalytisch gespalten, und in Folgereaktionen die Alkylreste gebildet. Inaktivierung stellt eine durch GSH vermittelte Metabolisierung im Sinne einer Entgiftung einer Substanz dar, die durch Konjugation, d.h. chemischer Bindung zwischen dem elektrophilen Substituenten des Fremdmoleküls und der nukleophilen SH-Gruppe des GSH, bewirkt wird. Weitere Schritte bis zur Bildung sog. Mercaptursäuren (siehe Figur 1.2.) können sich anschließen (CHASSEAUD, 1979).

Versuche mit Nitrosoguanidinen

Über NG-Mutagenese in Hefe ist bislang wenig bekannt. So wurden beispielsweise analog zu Bakterien zellzyklusabhängige Phasen unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber MNNG beschrieben, die Clusterung von Mutationen in der Nähe der Replikationsgabel und damit der Mechanismus der Replikationsgabel-Mutagenese postuliert (BURKE und FANGMAN, 1975; CARTER und DAWES, 1978; DAWES und CARTER, 1974; KEE und HABER, 1975).

Hefekulturen in exponentieller Wachstumsphase reagieren i.a. auf Chemikalienbehandlung sensibler als solche in stationärer Wachstumsphase (ZIMMERMANN et al., 1984; PARRY et al., 1976). Die in den vorliegenden Versuchen im Vergleich zu exponentiellen Zellen gefundene höhere Sensibilität stationärer Zellen nach MNNG-Behandlung war deshalb ungewöhnlich. Sie wurde zunächst auf mögliche experimentelle Fehler zurückgeführt. Eine Reihe von weiteren Versuchen in haploiden und diploiden Testerstämmen mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen konnten diesen Befund jedoch stützen. Auch andere Untersucher (CALDERON und CERDA-OLMEDO; 1983) bestätigten diese Beobachtungen. Die Autoren postulierten gleichzeitig einen cytoplasmatischen Faktor, der die Zellen in ihrer NG-Empfindlichkeit verändert.

In den vorliegenden Untersuchungen wiesen stationären Zellen nicht nur erhöhte Letalität, sondern auch erhöhte Genotoxizität auf. Dies führte zu der Arbeitshypothese, daß ein gemeinsamer Modifikator der NG-Cytotoxizität und -Genotoxizität existiert: Glutathion.

Erste Hinweise auf die in vivo Aktivierung von MNNG durch Thiolgruppen in Hefe wurden bereits 1969 (SÜSSMUTH und LINGENS) erbracht. Es war demnach zu erwarten, daß unterschiedliche zelluläre Antworten auf NG auf unterschiedliche Gehalte an freiem GSH zurückgeführt werden können.

Deshalb wurden zunächst die GSH-Gehalte in den Zellen bestimmt. Die GSH-Unterschiede zwischen Zellen aus stationärer und exponentieller Wuchsphase betrugen aus Flüssigkulturen ca. Faktor 5 und aus Plattenkulturen ca. Faktor 1.5. Sie lassen die gefundenen Unterschiede im Überleben und in der Genotoxizität als Folge wuchsphasenabhängiger Konzentrationsunterschiede von GSH möglich erscheinen.

Chemische GSH-Senkung durch Chloracetophenon in Zellen aus beiden Wuchsphasen reduzierten gleichermaßen die zellulären Antworten auf MNNG, was die Interpretation GSH-vermittelter NG-Letalität und -Mutagenese dann als wahrscheinlich erscheinen läßt.

Die Überlebenskurven des Diplonten D7 entsprechen den Überlegungen der GSH-abhängigen Zellabtötung. Für die Mutations- und Rekombinationskurven gilt dies jedoch nicht uneingeschränkt. Im niedrigen Dosisbereich wirkt MNNG in exponentiellen Zellen stärker mutagen und rekombinogen als in stationären. Dieser Befund ließe sich damit erklären, daß exponentielle (d.h. replizierende) Zellen stärker prämutationale Schäden anhäufen, da nach der Hypothese der Clustering solcher Schäden Alkylreste verstärkt in der Nähe der Replikationsgabel mit der DNA interagieren würden. Erst im höheren Dosisbereich würde die GSH-Konzentration in exponentiellen Zellen nicht mehr ausreichen, um die gleiche Anzahl von MNNG-Molekülen zu aktivieren wie in stationären Zellen.

Zwei wichtige Aspekte, die sich zusätzlich aus den Untersuchungen mit MNNG ergaben, sollen hier hervorgehoben werden.

- a) Unterschiedliche Antworten von Zellen auf Behandlung mit Chemikalien können durch den aktuellen Metabolisierungszustand bedingt sein. Dies erhebt die Forderung nach standardisierten Anzuchtbedingungen, was v.a. in der Routinetestung häufig nicht beachtet wird und zu falsch negativen oder positiven Resultaten führen kann.
- b) Da chemische GSH-Depletion meist nicht sehr spezifisch und ihre Wirkung zeitlich begrenzt ist, und sich die Isolation von GSH-Defektmutanten aufwendig und langwierig gestalten kann (falls solche nicht zur Verfügung stehen), wäre die Auswahl von Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen oder Anzuchtbedingungen eine einfache und billige Alternative, die GSH-Gehalte von Zellen zu manipulieren. Auf diese Weise ließe sich deren Empfindlichkeit gegenüber GSH-konjugierbaren Substanzen in Mutationstestungen verändern. Außerdem können auch durch bestimmte Anzuchtbedingungen niedrige GSH-Gehalte erreicht werden. Dies wurde bereits diskutiert.

Genetisch bedingte GSH-Depletion führt zu einer Verringerung der Letalität sowie der mutagenen und rekombinogenen Ereignisse in gsh⁻ Zellen nach MNNG- und ENNG-Behandlung. ENNG erweist sich dabei in beiden Zellpopulationen (GSH⁺ und gsh⁻) als das schwächere letale und mutagene Alkylans. Inkubationsversuche mit GSH-äquimolaren Konzentrationen von MNNG in Zeitabhängigkeit zeigen sowohl in Haplonten als auch in Diplonten einen biphasischen Kurvenverlauf mit einer (anfänglich) schnellen und einer langsamen Komponente. Der steile Kurvenverlauf repräsentiert offenbar den GSH-abhängigen Aktivierungsmechanismus, da dieser Abschnitt in den gsh⁻ Haplonten und Diplonten nur angedeutet ist. Die langsame Komponente zeigt in beiden Zellsystemen (gsh⁻ und GSH⁺) die gleiche Steigung und ist wahrscheinlich auf GSH-unabhängige Prozesse zurückzuführen.

Die Überlebenskurven der GSH^+ (und angedeutet) der gsh^- Diplonten sind gekennzeichnet von einem Schulterbereich, der in Haplonten nicht zu beobachten ist. Für diesem Befund kann gegenwärtig keine ausreichende Erklärung gegeben werden, obwohl für Diplonten spezifische DNA-Reparaturphänomene denkbar sind.

Versuche mit halogenierten Nitroaromaten

Als Substanzen, die vermutlich durch GSH entgiftet werden, wurden die Nitroaromaten CDNB und FDNB gewählt. Sie reagieren mit dem Thiylrest (GS^-) durch nukleophilen Austausch am halogenierten C-Atom des Rings.

CDNB wird trotz kontroverser Diskussionen in den USA immer noch als Haarwuchsstimulans bei Halbglatzen (*Alopecia areata*) verwendet (DAMAN et al., 1978), obwohl es im Ames-Test (Mutagenitätstest mit *Salmonella typhimurium*; AMES, 1979) eindeutig mutagen reagierte (SUMMER und GÖGGLMANN, 1980). Ferner ist CDNB ein Substrat, welches von GSH-S-Transferasen mit hoher Aktivität (durch überlappende Substratspezifität der verschiedenen GSH-S-Transferasenspezies) in Säugerzellen umgesetzt wird (JAKOBY, 1978) und deshalb zur Aktivitätsbestimmung der GSH-S-Transferasen in Geweben und Zell-Linien routinemäßig benutzt wird. Die von LAU et al. (1980) beschriebene Abwesenheit von GSH-S-Transferasen in Hefen konnte in dieser Arbeit durch Einsatz von CDNB als Substrat widerlegt werden, wenn auch die nachgewiesenen Aktivitäten gering waren.

Auch das fluorsubstituierte Analogon FDNB ist umstritten, was dessen mutagene Wirksamkeit angeht. Untersuchungen an Bakterien (KERKLAAN et al., 1985, 1986; MOHN et al., 1983) und Hefen (FAHRIG; 1979) zeigten positive Resultate, die von FAHRIG beschriebene mutagene und rekombinogene Wirkung von FDNB jedoch liegt in einem sehr engen Konzentrationsbereich. In Säugerzellen (V79 Chinese hamster ovary cells) allerdings wurde FDNB bislang als nicht-mutagen (keine außerplanmäßige DNA-Synthese; keine Schwester-Chromatidaustausche; negative

Resultate in den Mutationsvorwärtssystemen Quabain- und 6-Thioguanidinresistenz; WARREN et al., 1982), sondern allenfalls als tumorpromovierend (BOCK et al., 1969) beschrieben.

Beide Substanzen geben in der Hefetestung Überlebenskurven mit ausgeprägtem Schulterbereich und einem sich anschließenden Kurvenverlauf, der vor allem auf proteindenaturierende Effekte hindeutet (Giftkurven), wobei FDNB offenbar stärker wirkt als CDNB. Beide Substanzen besitzen bekanntermaßen hohes Reaktionsvermögen mit -SH und -NH₂ Gruppen und können damit schnell mit Aminosäuren, Peptiden und Proteinen reagieren (FAHRIG, 1979). Die ausgeprägte Schulter repräsentiert vermutlich die Schutzwirkung des GSH.

CDNB zeigt in Hefe praktisch keine mutagene Wirkung (die Induktion von Faktor 1.5 bis 1.8 lag im "Rauschbereich"). Auch im (GSH-äquimolaren) Konzentrationsbereich, in dem die Schulter in den steilen Kurventeil übergeht (600-800 nmol/10⁹ N), ist keine Mutationsinduktion festzustellen. In diesem schmalen Bereich, mit Überlebenskurven, die mit denen von Hefen starke Ähnlichkeit aufweisen, wurde im Hepatocyten-DNA-Reparaturtest (U. ANDRAE, unveröffentlicht) Aktivität gefunden. Dies sind bislang jedoch die einzigen positiven Hinweise auf mögliche DNA-CDNB-Wechselwirkung in Eukaryonten.

GSH-S-Transferasen (mit CDNB als Substrat) sind in Hefen vorhanden. Die nachgewiesenen Aktivitäten sowohl in Haplo- als auch in Diplo-onten sind allerdings sehr gering. Es ist daher zu vermuten, daß die eigentliche Aufgabe des Hefenzyms in der GSH-Konjugation bislang noch nicht identifizierter Substrate liegt. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung anderer Substanzklassen von Interesse, z.B. von GSH-konjugierbaren Pestiziden und Herbiziden, gegen die Hefen äußerst resistent sind, oder der Entfernung von Radikalspezies bzw. Peroxidmetaboliten.

Für FDNB wurde aufgrund der Ergebnisse zunächst genotoxische Aktivität in Hefe vermutet. Die Induktionskurven in GSH⁺ Haplonten und Diplonten sowohl für Mutation als auch für Rekombination waren steil und auf einen schmalen Konzentrationsbereich beschränkt und damit denen von FAHRIG (1979) gefundenen sehr ähnlich.

Verschiedene Gründe zwingen jedoch dazu, einen selektiven Prozess als wahrscheinlicher anzunehmen:

Mutationsinduktionskurven zeigen üblicherweise Kinetiken mit quadratischer Abhängigkeit (ECKARDT und HAYNES, 1977, 1980, 1981). Eine Abhängigkeit von der Dosis in der 3. Potenz weist bereits auf selektive Prozesse hin. Abhängigkeit von der Dosis in der 6.-8. Potenz, wie sie hier gefunden wurden, sind für Induktionsprozesse auszuschließen. Für die Vorstellung eines Selektionsprozesses spricht auch, daß auf den synthetischen Mangelmedien dosisunabhängig immer etwa die gleiche Zahl an Rückmutanten zu beobachten war. Die Berechnung der Mutationshäufigkeit führt bei stark erhöhter Letalität, jedoch gleicher Mutantenzahl, formal zu einer steilen Zunahme der Mutationsfrequenz.

Der Mutantenertrag ("mutant yield, Y" = $M[x] \cdot S[x]$), der eine Aussage über die Zahl der induzierten Mutanten in der gesamten Population gibt, macht eine Selektion wahrscheinlich, da im vorliegenden Fall keine dosisabhängige Zunahme der Yieldwerte zu beobachten war.

All diese Befunde lassen vermuten, daß FDNB keine echte mutagene, sondern nur selektive Wirkung auf bestimmte Zellen besitzt. Es gibt bislang allerdings keine Hinweise, welche Zellen selektiv bevorteilt sind.

Die intrazelluläre Konzentration von GSH beeinflusst die cytotoxische Wirkung von FDNB, und - wie im semiquantitativen Hemmhoftest nachgewiesen - auch die von CDNB. Dies konnte durch den Einsatz von gsh⁻ Mutanten gezeigt werden. Da jedoch die Mutationsinduktionskurven des gsh⁻ und GSH⁺ Stamms die gleichen Steigungen aufwiesen, unterstützt dies die Vorstellung eines GSH-unabhängigen Selektionsprozesses.

Tatsächlich konnte auch eine Selektion von GSH⁺ Revertanten in der behandelten gsh⁻ Population ausgeschlossen werden. Die Induktion von Enzymen, die bei der Entgiftung von Radikalen und der daraus entstehenden O₂ Metabolite eine Rolle spielen (Superoxid-Dismutase, GSH-Peroxidase, Katalase) ist denkbar, da sowohl FDNB wie CDNB radikalgenerierende Substanzen sind (BIAGLOW et al., 1983b; BIAGLOW, 1981). Allein dies könnte für schwer interpretierbare pleiotrope Effekte sorgen. Auch sind beide Substanzen potentielle Substrate für Nitroreduktasen.

Die Existenz und die Rolle verschiedener Nitroreduktasen in der Mutagenese sind in Salmonella typhimurium (ROSENKRANZ et al., 1982) und in Säugerzellen (BLUMER et al., 1980) beschrieben, nicht jedoch in Hefe. Versuche in gsh⁻ und Nitroreduktase-defekten (NR⁻) Salmonellastämmen (KERKLAAN et al., 1985; KERKLAAN et al., im Druck; Mutat. Res.) weisen auf die Beteiligung dieses Enzyms bei der FDNB- und CDNB-Toxizität und Mutagenese hin. Die Möglichkeit radikalgenerierender Prozesse wurde von den Autoren jedoch nicht in Betracht gezogen.

4.2.2. Radioprotektion von GSH

Es existiert eine Vielzahl von Untersuchungen über die Schutzfunktion von GSH bei Bestrahlung in Prokaryonten und höheren Eukaryonten. Diese Untersuchungen wurden mit chemisch (z.B. HARRIS, 1983; WARD, 1983) oder genetisch (CULLEN et al., 1980; DESCHAVANNE et al., 1981; EDGREN et al., 1980; MALAISE, 1983) GSH-depletierten Zellen durchgeführt. In all diesen Untersuchungen wurde nicht zwischen Induktion der Schäden (definiert als sog. präletale Schäden = PLL) und deren Reparatur unterschieden. Unter dem Aspekt der Radioprotektion durch Sulfhydrylgruppen wäre dies jedoch wichtig, um den möglichen Einfluß von GSH auf beide Prozesse zu trennen.

Nur wenige Arbeiten beschreiben die protektive Rolle von GSH bei ionisierender Bestrahlung in Hefe (BRUNBORG, 1977).

Was jedoch die Hefe zu einem interessanten Untersuchungsobjekt macht, liegt in der Möglichkeit, die Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSB), den eigentlich letalen Schäden, von deren Reparatur relativ einfach zu trennen:

Haploide Hefezellen im nicht-replizierenden Zustand (G1/G0-Phase) sind nicht in der Lage, DSB zu reparieren, weil dies die Anwesenheit zweier homologer DNA-Duplizes für die Rekombinationsreparatur voraussetzt (LUCHNIK et al., 1977). Somit läßt sich in stationären Haplonten die Induktion von DSB durch Überlebenskurven bestimmen. Verschiedenen Gruppen konnten in Bakterien (BONURA und SMITH, 1976), in Hefen (HO und MORTIMER, 1975; RESNICK und MARTIN, 1976) und anderen eukaryontischen Zellen (RESNICK, 1978; TAYLOR, 1978) nachweisen, daß DSB potentiell letale Schäden (PLL) darstellen, die unrepariert zum Tod der Zelle führen. Auf die experimentelle Beweisführung kann hier nicht näher eingegangen werden. Es sei jedoch erwähnt, daß diese Experimente vorwiegend an rad52- und temperatursensitiven rad54-3^{ts} Mutanten durchgeführt wurden (Mutanten der sog. RAD50-Epistasisgruppe, einer von drei bekannten DNA-Reparaturwegen in Hefe. Sie sind defekt in der Reparatur von DSB [HAYNES und KUNZ, 1981]).

Diplonten dagegen sind in der Lage, aufgrund des doppelten Genomsatzes DSB-Reparatur unter Nichtwuchsbedingungen durchzuführen (FRANKENBERG-SCHWAGER et al., 1980a; RESNICK, 1976).

Die Versuche mit GSH⁺ Haplonten zeigten, daß sie unter oxidischen Bedingungen gegenüber ionisierenden Strahlen empfindlicher reagieren als unter anoxischen (N₂). Dies drückt sich aus im sog. OER (oxygen enhancement ration; Sauerstoffverstärkungseffekt) aus und ist in Übereinstimmung mit der Erwartung, daß GSH nur unter anoxischen Bestrahlungsbedingungen Schutzwirkung ausüben kann. Nach dieser Theorie läuft die Reaktion von O₂ Radikalen mit Organomolekülen (als schädigendes Ereignis) in Konkurrenz mit der chemischen Ausheilung (Restitution) durch H-Donation von SH-Gruppen in den gleichen Molekülen ab.

Da jedoch die O_2 -Fixierung ein wesentlich schnellerer Prozess ist als die H-Donation, sollte der Schutzeffekt von GSH bei Anwesenheit von O_2 praktisch vernachlässigbar sein (ALPER und HOWARD-FLANDERS, 1956; HOWARD-FLANDERS, 1958; HOWARD-FLANDERS und MOORE, 1958).

Da jedoch gsh^- Mutanten auch unter oxidischen Bedingungen erhöhte Empfindlichkeit zeigen, steht dieses Resultat im Gegensatz zu dem Howard-Flanders-Modell. Es stützt jedoch eine neuere Hypothese von BIAGLOW et al. (1983b), die aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse erhöhter Radiosensibilität aerober Zellen nach Behandlung mit den GSH-Depletoren Diamid (oxidierend) und BSO (spezifisch und nicht-oxidativ) und den Radiosensibilisatoren Diethylmaleat (DEM) und N-Ethylmaleimid (NEM) (kovalent bindend) ohne OER-Veränderung (BIAGLOW et al., 1983a; CHAPMAN et al., 1973; HARRIS, 1983; KIMLER et al., 1977; VOS et al., 1976;) eine Beteiligung intrazellulärer Thiole in der aeroben Radioprotektion postulieren.

Die Autoren schreiben dabei dem GSH eine der primären Schadensinduktion nachgeschaltete Aufgabe der Detoxifizierung von O_2 Radikalen oder Hydroperoxiden zu:



(BWM = Biologisch wichtiges Molekül)

wobei eine GSH-Peroxidase (GSH-PX) Peroxide zu Alkohol reduziert, der wiederum über Hydrasen und Reduktasen weiter metabolisiert werden kann.

Dieses Modell kann jedoch nicht ohne weiteres auf Hefe übertragen werden, da bisher keine Hinweise auf eine GSH-PX in Hefe existieren. Hier wären weitere Untersuchungen nötig. Aus Säuger-Zellsystemen ist bekannt, daß ein Subtyp der GSH-S-Transferasen die enzymatische Aktivität einer GSH-PX (MEISTER und ANDERSON, 1983) besitzt. Die in Hefe gefundene GSH S-Transferase ließen sich auf deren möglichen GSH-PX-Aktivität untersuchen.

Die Untersuchungen an Diplonten ergaben völlig überraschende Resultate. Die Überlebenskurven GSH-defizienter (homoalle-lischer) Diplonten lagen sowohl unter O_2 als auch unter N_2 Bedingungen über denen des Wildtyps, d.h. sie besitzen offenbar eine höhere Reparatureffizienz für PLL als Wildtyp-Diplonten. Eine in den Mutanten mögliche Verlängerung der lag-Phasen per se (analog der in gsh⁻ Haplonten), in der die Mutanten mehr Zeit gehabt hätten, die PLL zu reparieren, war auszuschließen (siehe auch Punkt 3.3.7.).

Wuchskurven bestrahlter und unbestrahlter GSH⁺ und gsh⁻ Diplonten allerdings zeigten bei gsh⁻ Zellen eine starke Beeinträchtigung im Aufwuchs nach Bestrahlung. Dies wird folgendermaßen interpretiert: Ein großer Teil der Population ist nach Bestrahlung im Zellzyklus blockiert. Da dieser Zellzyklusblock jedoch wesentlich länger als in Wildtypzellen dauert (14 h gegenüber 9 h), haben die Zellen länger Zeit, diese PLL zu reparieren.

Es existieren eindeutige Evidenzen, daß das Enzym der RAD50-Epistasisgruppe nur ein geringes konstitutives Niveau besitzt und durch verschiedene Agentien wie γ -Strahlen und UV induzierbar ist (BUDD und MORTIMER, 1982, 1984; SIEDE et al., 1985). Daß eine gemeinsame Regulation oder gemeinsame Signale für Enzyminduktion und Zellzyklusblockierung vorliegen, ist durchaus vorzustellbar.

Das Phänomen von Zellzyklusblockierung in Eukaryonten durch ionisierende Strahlen ist mehrfach beschrieben (LÜCKE-HUHLE, 1982; PAINTER und YOUNG, 1975; SINCLAIR, 1967). Auch gibt es aus Versuchen mit humanen Lymphoidzellen erste klare Hinweise, daß die protektive Wirkung von GSH nicht nur durch den scavenging-Mechanismus oder der nachgeschalteten GSH-Peroxidase-Aktivität zustande kommt, sondern GSH direkt an Reparaturprozessen beteiligt ist (WELLNER et al., 1984; DESCHAVANNE et al., 1984). Untersuchungen von gsh⁻ Hefediplonten mit einem temperaturkonditionalen Defekt in der DSB-Reparatur könnten einen interessanten Beitrag zur Aufklärung GSH-gebundener Reparaturphänomene in Eukaryonten liefern.

Ziele, die auf der Grundlage der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beruhen, sollen nachfolgend kurz umrissen werden.

- a) Klonierung des GSH1-Gens. Dazu notwendige Rezipientenstämme wurden bereits konstruiert (gsh1-x ura3-52). Herstellung von gsh⁰ Mutanten (durch "gene disruption"). Sequenzierung des GSH1-Gens.
- b) Systematische Untersuchungen über das Wachstums- und Atmungsverhalten von gsh⁻ Stämmen in kontrollierten Fermentationen.
- c) Induktion und -Reparaturuntersuchungen von DNA-Strahlenschäden mit Hilfe von temperaturkonditionalen rad54-3^{ts} gsh⁻ Diploonten. Haploide Doppelmutanten wurden bereits hergestellt. Molare Quantifizierung der DSB mittels neutraler Saccharose-Dichte-zentrifugation.
- d) Weitere Untersuchungen zur GSH-abhängigen Bioinaktivierung von Xenobiotika, auch solchen mit Redoxeigenschaften (z.B. Quinone, Anthracycline, Bipyrridiniumsalze). Testung von relevanten Umweltchemikalien mit GSH-defizienten D7-Abkömmlingen.
- e) Untersuchungen zur Beziehung zwischen Bioaktivierung und -inaktivierung durch Konstruktion von Cytochrom P450 gsh⁻ Doppelmutanten. Mutanten mit fehlender Aktivierung durch Cytochrom P-450 stehen ebenfalls zur Verfügung.

Einige Teilprojekte werden bereits bearbeitet.

5. Zusammenfassung:

- Die genetische Analyse von Hefemutanten mit einem Defekt in der GSH-Biosynthese zeigt eine monogene rezessive Vererbung. Sie komplementieren nicht.
- Biochemische Untersuchungen machen einen Defekt im ersten Schritt der GSH-Biosynthese (γ -GCS) wahrscheinlich. Dieser Defekt führt zu GSH-Restgehalten zwischen 2-6%.
- Andere Enzyme des GSH-Metabolismus (GSH-Synthetase, γ -GTP, GR und GSH-S-Transferase) sind in den Mutanten mehr oder minder stark betroffen und können im Zusammenhang mit der pleiotropen Wirkung der GSH-Defizienz gesehen werden.
- Aus den unterschiedlichen Möglichkeiten, den GSH-Gehalt zu beeinflussen (Wuchsphase, Anzuchtbedingungen, chemische Senkung), stellt die genetisch bedingte GSH-Depletion die effizienteste Möglichkeit dar, einen GSH-abhängigen Fremdstoffmetabolismus zu erkennen. Verschiedene Substanzen wurden getestet und die in vivo aktivierende (MNNG, ENNG) und inaktivierende (CDNB, FDNB) Fähigkeit von GSH in Hefe belegt.
- GSH-Defizienz verursacht nicht nur veränderte Sensibilität (Überleben), sondern auch veränderte genetische Antworten (Mutation, Rekombination). Abkömmlinge des Testerstamms D7 mit homoallelischen gsh⁻ Allelen wurden konstruiert und bereits erprobt. Durch ihren Einsatz lassen sich cyto-toxische sowie mutagene/rekombinogene Ereignisse gleichzeitig erfassen.
- Die Identifikation von unbekannten Substanzen oder Substanzgemischen mit GSH-vermittelten Metabolismus sollte mit einem in dieser Weise sensibilisierten Eukaryontensystem in vivo möglich sein.

- Untersuchungen über die Rolle von GSH in der Radioprotektion sind durch den Einsatz von gsh⁻ Zellen möglich. Die Schutzwirkung von GSH auf der Ebene der Schadenserzeugung durch ionisierende Strahlen und auf der der Reparatur läßt sich durch den Einsatz von Haplonten und Diplonten trennen.

- gsh⁻ Haplonten zeigen höhere Empfindlichkeit gegenüber ionisierenden Strahlen sowohl unter aeroben als auch unter anoxischen Bedingungen, was auf eine Beteiligung von GSH auch in der aeroben Radioprotektion (evt. auf Ebene der DNA-Reparatur) hindeutet.

- gsh⁻ Diplonten überleben nach Bestrahlung besser als GSH⁺ Diplonten. Wuchskurven deuten darauf hin, daß sie durch einen Block im Zellzyklus länger Zeit zur Reparatur der gesetzten Schäden haben.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mit dazu beigetragen haben, daß die vorliegende Arbeit in dieser Form realisiert werden konnte.

Mein besonderer Dank gilt Fr. Priv. Doz. Dr. F. Eckardt für ihre stete Diskussionsbereitschaft und dem Engagement in der Betreuung dieser Arbeit;

Herrn Prof. Dr. U. Hagen für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes an der GSF (Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH) und die großzügige Weise, meine Aus- und Fortbildung zu unterstützen;

Herrn Dr. K.H. Summer (Institut für Toxikologie der GSF) für seine wertvollen Anregungen und die Bereitstellung von Material und Geräten für die biochemischen Arbeiten;

Herrn Dr. K. Maier (Institut für Enzymchemie der GSF) für die bereitwillige Hilfe in der Etablierung eines Tests zur Bestimmung der γ -Glutamyl-Cystein Synthetase (γ -GCS) mittels der Aminosäureanalyse und der Aufarbeitung zahlreicher Proben im Aminosäure-Analysator;

der technischen Assistentin Fr. U. Nevries, ohne deren Hilfe viele Versuche nicht möglich gewesen wären;

meinem Mitdoktoranden W. Siede für seine kritischen Diskussionsbeiträge und wertvollen Anregungen.

LEBENS LAUF

Manfred Kistler,

geboren am 27.02.1951 in Olching, Kreis Fürstenfeldbruck

verheiratet seit 07.10.1984 mit Gabriele Kistler, geb.

Schmittlein

2 eheliche Kinder: Manuel Sebastian Kistler, geb. 10.04.84

Anna Katharina Kistler, geb. 02.07.86

Schulischer und beruflicher Werdegang:

1957-1963 Volksschule Olching

1963-1967 Realschule Fürstenfeldbruck

1967-1969 Lehrausbildung als Kaufmann im Großhandel

1969-1971 Berufliche Tätigkeit

1971-1974 Studium der Betriebswirtschaft an der
Fachhochschule München mit Abschluß Diplom

1974-1982 Studium der Biologie an der Universität München
mit Abschluß Diplom

1982-1983 Werkstudent an der GSF, Neuherberg

1983-1986 Doktorarbeit an der GSF, Institut für Strahlenbio-
logie, Neuherberg; betreut durch Fr. Priv. Doz.
Dr. F. Eckardt an der GSF und H. Prof. Dr. Dr. U.
Hagen an der LMU-München

6. Literaturliste:

Allison, R.D. und A. Meister (1981) Evidence that transpeptidation is a significant function of γ -glutamyl transpeptidase, *J. Biol. Chem.*, 256, 2988-2992.

Alper, T. und P. Howard-Flanders (1956) Role of oxygen in modifying the radiosensitivity of Escherichia coli B, *Nature*, 78, 978-979.

Ames, B.N. (1979) Identifying environmental chemicals causing mutational cancer, *Science*, 204, 587-593.

Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens (Oxygen radicals and degenerative diseases), *Science*, 221, 1256-1264

Ames, B.N. (1984) Cancer and diet, *Science*, 224, 668-670, und 757-760.

Apontoweil, P. und W. Berends (1975a) Isolation and initial characterization of glutathione deficient mutants of Escherichia coli K12, *Biochem. Biophys. Acta*, 399, 10-22.

Apontoweil, P. und W. Berends (1975b) Mapping of gshA, a gene for the biosynthesis of glutathione in Escherichia coli K12, *Mol. Gen. Genet.*, 141, 91-95.

Astor, B.M. (1984) Radiobiological studies with a series of human cell lines of varying glutathione content, *Brit. J. Radiology*, 57, 717-722.

Babson, J.R., N.S. Abell und D.J. Reed (1981) Protective role of the glutathione redox cycle against adriamycin-mediated toxicity in isolated hepatocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 30, 2299-2304.

Bachur, N.R., S.L. Gordon, M.V. Gee und H. Kon (1979) NADPH cytochrome P-450 reductase activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 954-975.

Bacq, Z.M. und P. Alexander (1961) Fundamentals of Radiobiology. Oxford, London, New York: Pergamon Press.

Barale, R., D. Rusciano, G. Stretti, D. Zucconi, M. Monaco, P. Monesso und P. Principe (1983) The induction of forward gene mutation and gene conversion in yeasts by treatment with cyclophosphamide in vitro and in vivo, *Mutat. Res.*, 111, 295-312.

Bauer, W. und H.-G. Kirk (1985a) Synthesis of glutathione with Saccharomyces cerevisiae in solid-state and submerged culture fermentation, *Biotech-Forum*, 2, 130-131.

Bauer, W. und H.-G. Kirk (1985b) Untersuchungen zur Glutathion-Synthese mit Saccharomyces cerevisiae in Solid-State und Submers-Fermentation, Biotech-Forum, 2, 132-138.

Bergmeyer, A.U. (1974) Methoden der enzymatischen Analyse II, Weinheim/Bergstraße: Verlag Chemie, 1688/1692.

Beutler, E. (1983) Active transport of glutathione disulfid from erythrocytes. In: Functions of Glutathione: Biochemical, Physiological, Toxicological, and Clinical Aspects (Hrsg.: A. Larsson, S. Orrenius, A. Holmgren, B. Mannervik), 65-74. New York: Raven Press.

Biaglow, J.E. (1981) Cellular electron transfer and radical mechanisms for drug metabolism, Radiat. Res., 86, 212-242.

Biaglow, J.E. und M.E. Varnes (1983) The role of thiols in cellular response to radiation and drugs. Symposium on Thiols at the 31st Annual Scient. Meeting of the Radiation Research Society, San Antonio, TX, USA, 27.2.-3.3.83. In: Radiat. Res., 95, 437-455.

Biaglow, J.E., M. Morse-Gaudion und M.E. Varnes (1983a) Characterization of the radiation response of the A549 human lung carcinoma, Radiat. Res., 94, Abstract.

Biaglow, J.E., M.E. Varnes, M. Astor, J. Mitchell und A. Russo (1983b) Intracellular thiols: involvement in drug metabolism and radiation response. In: Radioprotectors and Anticarcinogens (Hrsg.: O.F. Nygaard and M. Simic), 203-236. New York: Academic Press.

Blumer, J.L., A. Friedman, L.R.W. Meyer, E. Fairchild, L.T. Webster und W.T. Speck (1980) Relative Importance of Bacterial and Mammalian Nitroreductases for Niridazole Mutagenesis, Cancer Res., 40, 4599-4605.

Bock, F.G., A. Fjelde, H.W. Fox und E. Klein (1969) Tumor promotion by 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, a potent skin sensitizer, Cancer Res., 29, 179-182.

Bonura, T. und K.C. Smith (1976) The involvement of indirect effects in cell killing and DNA double-strand breakage in γ -irradiated Escherichia coli, Intern. J. Radiat. Biol., 29, 293-296.

Botstein, D. und E.W. Jones (1969) Nonrandom mutagenesis of the E. coli genome by nitrosoguanidine, J. Bacteriol., 98, 847-848.

Boyland, E. und L.F. Chausseaud (1969) The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis, Adv. Enzymol., 32, 173-219.

Brunborg, G. (1977) Variations in the SH-content of haploid yeast and their relevance to radiosensitivity, Int. J. Radiat. Biol., 32, 3, 285-292.

Brusick, D. (1980) Principles of Genetic Toxicology, New York: Plenum Press.

Budd, M. und R.K. Mortimer (1982) Repair of double-strand breaks in a temperature conditional radiation-sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae, Mutat. Res., 103, 19-24.

Budd, M. und R.K. Mortimer (1984) The effect of cycloheximide on repair in a temperature conditional radiation-sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae, Radiat. Res., 99, 582-590.

Burke, W. und W.L. Fangman (1975) Temporal order in yeast chromosome replication, Cell, 5, 263-269.

Calderon, I.L. und E.Cerda-Olmedo (1983) Induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine of nuclear and cytoplasmic mutations in Saccharomyces cerevisiae, Mutat. Res., 108, 133-146.

Callen, D.F. und R.M. Philpot (1977) Cytochrome P-450 and the activation of promutagens in Saccharomyces cerevisiae, Mutat. Res., 45, 304-324.

Cerda-Olmedo, E. P.C. Hanawalt und N. Guerola (1968) Mutagenesis of the replication point by nitrosoguanidine: map and pattern of replication of the E. coli chromosome, J. Mol. Biol., 33, 705-719.

Chapman, J.D., A.P. Reuvers, J. Borsa und C.L. Greenstock (1973) Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro, Radiat. Res. 56, 291-306.

Carter, B.L.A. und I.W. Dawes (1978) Nitrosoguanidine mutagenesis during the yeast cell cycle, Mutat. Res., 51, 289-292.

Chasseaud, L.F. (1979) The role of glutathione and glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents, Adv. Canc. Res., 29, 175-274.

Cullen, M., A. Michaloski, H.C. Walker und L. Revesz (1980) Correlation between the radiobiological oxygen constant, K, and the non-protein sulfhydryl content of mammalian cells, Int. J. Radiat. Biol., 38, 525-535.

Daman, A.L., E.W. Rosenberg und L. Drake (1978) Treatment of alopecia areata with dinitrochlorobenzene, Arch. Dermatol., 114, 1036-1038.

Dawes, I.W. und B.L.A. Carter (1974) Nitrosoguanidine mutagenesis during nuclear and mitochondrial replication, Nature, 250, 709-712.

de Rey-Pailhade, J. (1888) Nouvelles recherches physiologiques sur la substance organique hydrogénant le soufre à froid, C. R. Acad. Sci., 107, 43-44.

Deschavanne, P.J., J. Midander, M. Edgren, A. Larsson, E.P. Malaise und L. Revesz (1981) Oxygen enhancement of radiation induced lethality is greatly reduced in glutathione deficient human fibroblasts, Biomedicine, 35, 35-37.

Deschavanne, P.J., N. Chavaudra, D. Debieu und E.P. Malaise (1984) Reduced PLD repair ability in glutathione synthetase deficient human fibroblasts after UV irradiation, Int. J. Radiat. Res., 46, 375-382.

Dertinger, H. und H. Jung (1969) Molekulare Strahlenbiologie. Heidelberg: Springer.

Dethmers, J.K. und A. Meister (1981) Glutathione export by human lymphoid cells: depletion of glutathione by inhibition of its synthesis decreases export and increases sensitivity to irradiation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 7492-7496.

Eckardt, F. und R.H. Haynes (1977) Kinetics of mutation induction by ultraviolet light in excision deficient yeast, Genetics, 85, 225-247.

Eckardt, F. und R.H. Haynes (1980) Quantitative measures of mutagenicity and mutability based on mutant yield data, Mutat. Res. 74, 439-458.

Eckardt, F. und R.H. Haynes (1981) Quantitative measures of induced mutagenesis. In: Short Term-Tests of Chemical Carcinogens (Hrsg.: H.F. Stich und R.H.C. San), 457-473. New York: Springer.

Edgren, M., A. Larsson, K. Nilsson, L. Revesz und O.C.A. Scott (1980) Lack of oxygen effect in glutathione-deficient human cells in culture, Int. J. Radiat. Biol., 37, 299-306.

Edgren, M., L. Revesz und A. Larsson (1981) Introduction and repair of single-strand DNA breaks after X-irradiation of human fibroblasts deficient in glutathione, Int. J. Radiat. Biol., 40, 355-363.

Ellman, G.L. (1959) Tissue Sulfhydryl Groups, Archives of Biochemistry and Biophysics, 82, 70-77.

Fahey, R.C. und G.L. Newton (1983) The occurrence of low molecular weight thiols in biological systems. In: Functions of Glutathione - Biochemical, Physiological Toxicological, and Clinical Aspects (Hrsg.: A. Larsen et al.), 251-260. New York: Raven Press.

Fahey, R.C., S. Brody und X. Micolajczyk (1975) Changes in the glutathione thiol-disulfide status of Neurospora crassa conidia during germination and aging, J. Bacteriol., 121, 144-151.

Fahrig, R. (1979) Evidence that induction and suppression of mutations and recombination by chemical mutagens in Saccharomyces cerevisiae during mitosis are jointly correlated, Molec. Gen. Genet., 168, 125-139.

Fiechter (1975) Continious cultivation of yeasts. In: Methods in Cell Biology, Vol XI (Hrsg.: D.M. Prescott), 97-130. New York: Academic Press.

Foster, P.L. und E. Eisenstadt (1985) Induction of transversion mutations in Escherichia coli by N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin is SOS dependent, J. Bacteriol., 163, 213-220.

Fowell, R.R. (1969) Sporulation and Hybridization of Yeast. In: The Yeasts, Vol. 1 (Hrsg.: A.H. Rose und J.S. Harrison), 303-383. New York: Academic Press.

Frankenberg, D. und M. Frankenberg-Schwager (1981) Interpretation of the shoulder of dose-response curves with immediate plating in terms of repair of potentially lethal lesions during a restricted time period, Int. J. Radiat. Biol., 39, 6, 617-631.

Frankenberg, D., M. Frankenberg-Schwager und R. Harbich (1984) Split-dose recovery is due to the repair of DNA double-strand breaks, Int. J. Radiat. Biol., 46, 5, 541-553.

Frankenberg-Schwager, M., D. Frankenberg, D. Blöcher und C. Adamczyk (1980a) Repair of DNA double-strand breaks in irradiated yeast cells under nongrowth conditions, Radiat. Res., 82, 498-510.

Frankenberg-Schwager, M., D. Frankenberg, D. Blöcher und C. Adamczyk (1980b) The linear relationship between DNA double-strand breaks and radiation dose (30 MeV electrons) is converted into a quadratic functions by cellular repair, Int. J. Radiat. Biol., 37, 2, 207-212.

Fuchs, J.A. und H.R. Warnes (1975) Isolation of an Escherichia coli mutant deficient in glutathione synthesis, J. Bacteriol., 124, 140-148.

Grenson, M., C. Hou und M. Crabeel (1970) Multiplicity of the Amino Acid Permeases in Saccharomyces cerevisiae. Evidence for a General Amino Acid Permease, J. Bacteriol., 103, 770-777.

Griffith, O.W. und A. Meister (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine), J. Biol. Chem., 254, 7558-7560.

Griffith, O.W. und A. Meister (1985) Origin and turnover of mitochondrial glutathione, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4668-4672.

Guerola, N., J.L. Ingraham und E. Cerda-Olmedo (1971) Induction of closely linked multiple mutations by nitroso-guanidine, Nature, 230, 122-125.

Guzmann-Barron (1951) Adv. Enzym., 11, 201-266.

Habig, W.H., M.J. Pabst und W.B. Jakoby (1974) Glutathione S-transferases, J. Biol. Chem., 249, 22, 7130-7139.

Habig, W.H. (1983) Glutathione S-transferases: versatile enzymes of detoxification. In: Radioprotectors and Anticarcinogens (Hrsg.: O.F. Nygaard und M. Simic), 169-190. New York: Academic Press.

Hamada, S., H. Tanaka und K. Sakato, Pat. Nr. EPO 029241 A2, Process for producing glutathione.

Harris, J.W. (1983) Cellular thiols in radiation and drug response: use of specific reagents. In: Radioprotectors and Anticarcinogens (Hrsg.: O.F. Nygaard und M. Simic), 255-274. New York: Academic Press.

Harris, J.W. und J.E. Biaglow (1972) Non-specific reactions of the glutathione oxidant "diamide" with mammalian cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 46, 1743-1749.

Haynes, R.H. und F. Eckardt (1980) Analysis of dose-response patterns in Mutation Research, Can. J. Genet. Cytol., 21, 277-302.

Haynes, R.H. und B. Kunz (1981) DNA repair and mutagenesis in yeast. In: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Life Cycle and Inheritance (Hrsg.: J.N. Strathern, E.W. Jones und J.R. Broach), 371-411. Cold Spring Harbour.

Ho, K. und R.K. Mortimer (1975) X-Ray induced dominant lethality and chromosome breakage and repair in a radiosensitive strain of yeast. In: Molecular Mechanisms for Repair of DNA (Hrsg.: R.C. Hanawalt und R.B. Setlow), 545- 547. New York: Plenum Press.

Högberg, J., J. Anundi, A. Kristoferson und J. Rajs (1980) Lipid peroxidation induced by glutathione depletion. In: Microsomes, Drug Oxidations, and Chemicals Carcinogenesis, 769-772. New York: Academic Press.

Howard-Flanders, P.H. (1958) Physical and chemical mechanisms in the injury of cells by ionizing radiations. Adv. Biol. Med. Phys., 6, 553-603.

- Howard-Flander, P.H. und D. Moore (1958) The time interval after pulsed irradiation within which injury to bacteria can be modified by dissolved oxygen, *Radiat. Res.* 9, 422-437.
- Hopkins, F.G. (1921) On an autoxidisable constituent of the cell, *Biochem. J.*, 15, 286-305.
- Jakoby, W.B. (1978) The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins, *Advanc. Enzymol.*, 36, 383-414.
- Jaspers, C.J. und M.J. Penninckx (1981) On the role of glutathione in the transport of amino acids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Contradictory results, *FEBS Letters*, 132, 41-44.
- Jaspers, C.J. und M.J. Penninckx (1982) Occurrence of glutathione S-transferase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, 30.
- Jaspers, C.J. und M.J. Penninckx (1984) Glutathione metabolism in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence that γ -glutamyltranspeptidase is a vacuolar enzyme, *Biochimie*, 66, 71-74.
- Jaspers, C.J., D. Gigot und M.J. Penninckx (1985) Pathways of Glutathione Degradation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Phytochemistry*, 24, 703-707.
- Jocelyn, P.C. (1958) Glutathione metabolism in animals, *Biochem J.*, 68, 36ff.
- Kappus, H. (1986) Overview of enzyme systems involved in bioreduction of drugs and in redox cycling, *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1-6.
- Katsunuma, T., E. Schött, S. Elsässer und H. Holzer (1972) Purification and properties of Tryptophane-Synthase-inactivating enzymes from yeast, *Eur. J. Biochem.*, 27, 520-526.
- Kee, S.G. und J.E. Haber (1975) Cell cycle-dependent induction of mutations along a yeast chromosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1179-1183.
- Kelly, S.L., D.E. Kelly, D.J. King und A. Wiseman (1985) Interaction between yeast cytochrome P-450 and chemical carcinogens, *Carcinogenesis*, 6, 1321-1325.
- Kerklaan, P., S. Bouter und G. Mohn (1983) Isolation of a mutant of *Salmonella typhimurium* strain TA1535 with decreased levels of glutathione (gsh⁻). Primary characterization and chemical mutagenesis studies, *Mutat. Res.*, 122, 257-266.
- Kerklaan, P., C.E.M. Zoetemelk und G. Mohn (1985) Mutagenic activity of various chemicals in *Salmonella* strain TA100 and glutathione deficient derivatives, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2151-2156.

Kerklaan, P.R.M., S. Bouter, J.M. teKopele, N.P.E. Vermeulen, P.J. van Bladeren und G. Mohn (1986) Mutagenicity of halogenated and other substituted dinitrobenzenes in Salmonella typhimurium and derivatives deficient in glutathione (TA100/GSH⁻) and nitroreductase (TA100NR), Mutat. Res. (im Druck).

Ketterer, B. (1982) The role of nonenzymatic reactions of glutathione in xenobiotic metabolism, Drug Metab. Rev., 13 (1), 161-187.

Kiefer, J. (1981) Biologische Strahlenwirkung. Berlin: Springer.

Kimler, B.F., W.K. Sinclair und M.M. Elkind (1977) N-ethyl maleimide sensitization of X-irradiated hypoxic Chinese hamster cells, Radiat. Res. 71, 204-213.

Kistler, M., K.-H. Summer und F. Eckardt (1986) Isolation of glutathione deficient mutants of the yeast Saccharomyces cerevisiae, Mutat. Res. 173, 117-120.

Knipppers, R. (1985) Molekulare Genetik. Stuttgart: Thieme.

Kosower, E.M. und N.S. Kosower (1969) Lest I forget thee, glutathione... , Nature, 224, 117-120.

Kosower, E.M. und N.S. Kosower (1978) Glutathione status of cells, Int. Rev. Cytol., 54, 109-160.

Krohne-Ehrich, G. und R. Untucht-Grau (1976) Glutathion, Biologie in unserer Zeit, 6, 175-182.

Lau, E.P., L. Niswander, D. Watson und R.R. Fall (1980) Glutathione S-transferase is present in a variety of microorganisms, Chemosphere, 9, 565-569.

Lawley, P.D. und C.H. Thatcher (1970) Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, Biochem. J., 116, 693-707.

Lehninger, A.L. (1975) Biochemistry. New York: Worth Publishers.

Leland, A.L. (1964) Dithiotreitol, an new protective reagent for SH-groups, Biochemistry, 3, 480-482.

Lindegren, C.C. und G. Lindegren (1943) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 29, 306-308.

Luchnik, A.N., V.M. Glaser und S.V. Shestakov (1977) Repair of DNA double-strand breaks requires two homologous DNA duplexes, Mol. Biol. Rep., 3, 437-442.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.

Lücke-Huhle, C. (1982) Alpha-irradiation-induced G2 delay: a period of cell recovery, *Radiat. Res.*, 89, 298-308.

Malaise, E.-Ph. (1983) Reduced oxygen enhancement of the radiosensitivity of glutathione-deficient fibroblasts, *Radiat. Res.*, 95, 486-494.

Marmiroli, N., F. Tassi, L. Bianchi, A.A. Algeri, P.P. Puglisi und M.S. Esposito (1981) Erythromycin and cycloheximide sensitivities of protein and RNA synthesis in sporulation cells of *Saccharomyces cerevisiae*: Environmentally induced modifications controlled by chromosomal and mitochondrial genes, *Curr. Genet.*, 4, 51-62.

McIntyre, T.M. und N.P. Courthoys (1980), The interorgan metabolism of glutathione, *Int. J. Biochem.*, 12, 545-551.

Margison, G.P. und P.J. O'Connor (1979) Nucleic acid modification by N-nitroso compounds. In: *Chemical Carcinogens and DNA* (Hrsg.: P.L. Grover), 111-152. Boca Raton: CRC Press.

Matile, P., H. Moor und C.F. Robinow (1969) Yeast Cytology. In: *The Yeasts*, Vol. 1 (Hrsg.: A.H. Rose und J.S. Harrison), 219-302. New York: Academic Press.

Meister, A. (1982) 5-oxoprolinuria (pyroglutamic aciduria) and other disorders of the γ -glutamyl cycle. In: *Metabolic Basis of Inherited Diseases* (Hrsg.: J.B. Stanbury et al.), 348-359. New York: McGraw Hill.

Meister, A. (1983) Glutathione metabolisms and transport. In: *Radioprotectors and Anticarcinogens* (Hrsg.: O.F. Nygaard und M. Simic), 121-151. New York: Academic Press.

Meister, A. (1984) New aspects of Glutathione biochemistry and transport: selective alteration of glutathione metabolism, *Federations proceedings*, 43, 3031-3042.

Meister, A. und M.E. Anderson (1983) Glutathione, *Ann. Rev. Biochem.*, 52, 711-760.

Meredith, M.J. und D.J. Reed (1982) Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte, *J. Biol. Chem.*, 257, 3747-3753.

Mitchell, J.B. und A. Russo (1983) Thiols, thiol depletion, and thermosensitivity. Symposium on Thiols at the 31st Annual Scient. Meeting of the Radiation Research Society, San Antonio, TX, USA, 27.2.-3.3.83. In: *Radiat. Res.*, 95, 471-485.

Mitchell, J.B., A. Russo, J.E. Biaglow und S. McPherson (1983) Cellular glutathione depletion of diethyl maleate or buthionine sulfoximine: effect of glutathione depletion on the oxygen enhancement ratio, *Radiat. Res.*, 96, 422-428.

Mohn, G., P.de Knijff und A. Baars (1983) Cellular glutathione content and sensitivity to alkyl-nitrosoguanidine-induced lethality and mutagenesis in Escherichia coli K12, Mutat. Res., 111, 25-31.

Mooz, E.D. (1979) Association of glutathione deficiency and diminished amino acid transport in yeast, Bioch. Biophys. Res. Commun., 90, No 4, 1221-1228.

Mooz, E.D. und A. Meister (1967) Tripeptide (Glutathione) synthetase. Purification, Properties, and Mechanism of action, Biochemistry, 6, 1722-1734.

Mooz, E.D. und L. Wigglesworth (1976) Evidence for the γ -glutamyl cycle in yeast, Biochem. Biophys. Res. Commun., 68, 1066-1072.

Mortimer, R.K. und D.C. Hawthorne (1969) Yeast Genetics. In: The Yeasts, Vol 1 (Hrsg.: A.J. Rose und J.S. Harrison), 385-460. New York: Academic Press.

Murata, K., K. Tani und J. Kato (1978) Continuous production of glutathione by immobilized Saccharomyces cerevisiae cells containing an ATP-regeneration system, Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn., 11, 72-77.

Murata, K., K. Tani, J. Kato und J. Chibata (1980) Continuous production of glutathione using immobilized microbial cells containing an ATP-generating system, Biochemie, 62, 347-352.

Nestmann, E.R. (1975) Mutagenesis by nitrosoguanidine, ethyl methanesulfonate, and mutator gene mutH in continuous culture of Escherichia coli, Mutat. Res., 28, 323-330.

Nishimura, J.S., E.A. Dodd und A. Meister (1964), Intermediate formation of dipeptide-phosphate anhydride in enzymatic tripeptide synthesis, J. Biol. Chem., 239, 2553-2558.

Orlowski, M. und A. Meister (1963) γ -glutamyl-p-nitroanilide: a new convenient substrate for determination and study of L- and D- γ -glutamyltranspeptidase activities, Biochim. Biophys. Acta, 73, 679-681.

Orlowski, M. und A. Meister (1970) The γ -Glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 1248-1255.

Osuji, G.O. (1980) The kinetics of the γ -Glutamyl cycle-mediated uptake of amino acids, FEBS-Letters, 110, 192-194.

Painter, R.B. und B.R. Young (1975) X-Ray induced inhibition of DNA-synthesis in chinese hamster ovary, human HeLa, and mouse L cells, Radiat. Res., 64, 648-656.

Parry, J.M., P.J. Davies und W.E. Evans (1976) The effects of "cell age" upon the lethal effects of physical and chemical mutagens in the yeast Saccharomyces cerevisiae, Molec. Gen. Genet., 146, 27-35.

Payne, G.M. und J.W. Payne (1984) γ -Glutamyltransferase is not involved in the bulk uptake of amino acids, peptides or γ -glutamyl-amino acids in yeast (Saccharomyces cerevisiae), Biochem. J., 218, 147-155.

Penninckx, M.J. , C.J. Jaspers und J.-M. Wiame (1980) Glutathione-Metabolism in relation to the amino acid permeation systems of the yeast Saccharomyces cerevisiae, Eur. J. Biochem., 104, 119-123.

Penninckx, M.J. und C.J. Jaspers (1982) On the role of glutathione in microorganisms, Bulletin de l'Institut Pasteur, 80, 291-301.

Penninckx, M.J. und C.J. Jaspers (1985) Molecular and kinetic properties of purified γ -glutamyl transpeptidase from yeast (Saccharomyces cerevisiae), Phytochemistry, 24, 1913-1918.

Penninckx, M.J. C. Jaspers und J.M. Wiame (1980) Glutathione metabolism in relation to the amino-acid permeation systems of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Occurrence of γ -glutamyltranspeptidase: Its regulation and the effects of permeation mutations on the enzyme cellular level, Eur. J. Biochem., 104, 119-123.

Pirt, S.J. (1975) Principles of Microbe and Cell Cultivation. Oxford: Blackwell Scientific Publication.

Puglisi, P.P. und E. Zennaro (1971) Erythromycin inhibition of sporulation in Saccharomyces cerevisiae, Experientia, 27, 963-964.

Racker, E. (1955) Glutathione reductase from baker's yeast and beef liver, J. Biol. Chem., 217, 855-865.

Rannug, U., A. Sundvall und C. Ramel (1978) The mutagenic effect of 1,2-dichloroethane on Salmonella typhimurium I. Activation through conjugation with glutathion in vitro, Chem. Biol. Interact., 20, 1-16.

Reed, D.J. (1983) Regulation and function of glutathione in cells. In: Radioprotectors and Anticarcinogens (Eds.: O.F. Nygaard und M. Simic), 153-168. New York: Academic Press.

Reed, D.J. (1986) Regulation of reductive processes by glutathione, Biochem. Pharmacol., 35, 7-13.

Resnick, M.A. (1976) The repair of double-strand breaks in DNA: A model involving recombination, J. Theor. Biol., 59, 97-106.

Resnick, M.A. (1978) Similar responses to ionising radiation of fungal and vertebrate cells and the importance of DNA double-strand breaks, J. Theor. Biol., 71, 339-346.

Resnick, M.A. und P. Martin (1976) The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of Saccharomyces cerevisiae and its genetic control, Mol. Gen. Genet., 143, 119-129.

Révész, L. (1983) Studies with glutathione-deficient human cells. In: Radioprotectors and Anticarcinogens (Hrsg.: O.F. Nygaard and M. Simic), 237-253. New York: Academic Press.

Robins, R.J. und D.D. Davies (1980) The role of glutathione in amino acid absorption by yeast, FEBS-Letters, 111, 432.

Robins, R.J. und D.D. Davies (1981) The role of glutathione in amino acid absorption, Biochem. J., 194, 63-70.

Rosenkranz, E.J., E.C. McCoy, R. Mermelstein und H.S. Rosenkranz (1982) Evidence for the existence of distinct nitroreductases in Salmonella typhimurium: roles in mutagenesis, Carcinogenesis, 3, 121-123.

Samuels, P.J. (1953) The assimilation of amino acids by bacteria. 17. Synthesis of glutathione by extracts of Escherichia coli, Biochem J., 55, 441-444.

Schroeder, E.F., V. Collier und G.E. Woodward (1939) A simplified method for the isolation of glutathione from yeast, Biochem. J., 33, 1180-1181.

Sedgwick, B. und P. Robins (1980) Isolation of mutants of Escherichia coli with increased resistance to alkylating agents; mutants deficient in thiols and mutants constitutive for the adaptive response, Molec. Gen. Genet., 180, 85-90.

Seelig, G.F. und A. Meister (1984) γ -Glutamylcysteine synthetase from erythrocytes, Anal. Biochem., 141, 510-514.

Sherman (1975) Use of Micromanipulation in yeast studies. In: Methods in Cell Biology, Vol XI (Hrsg.: D.M. Prescott), 189-199. New York: Academic Press.

Siede, W., S. Obermaier und F. Eckardt (1985) Influence of different inhibitors on the activity of the RAD54 dependent step of DNA repair in Saccharomyces cerevisiae, Radiat. Environ. Biophys., 24, 1-7.

Singer, B. (1982) Mutagenesis from a chemical perspective. In: Molecular and Cellular Mechanisms of Mutagenesis (Hrsg.: J.F. Lemontt und W.M. Generosa), 1-42. New York, London: Plenum Press.

Sies, H. and K.H. Summer (1975) Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver, *Eur. J. Biochem.*, 57, 503-512.

Sinclair, W.K. (1967) Radiation effects on mammalian cell populations in vitro, *Radiat. Res.*, *Proceed. of the 3rd Intern. Congress of Radiat. Res.*, 607-631.

Snoke, J.E. (1955) Isolation and Properties of Yeast Glutathione Synthetase, *J. Biol. Chem.*, 213, 813-824.

Snoke, J.E. und K. Bloch (1952) Formation and utilization of γ -glutamyl-cysteine in glutathione synthesis, *J. Biol. Chem.*, 199, 407-414.

Snoke, J.E. und K. Bloch (1955) Studies on the mechanism of action of glutathione synthetase, *J. Biol. Chem.*, 213, 825-835.

Snoke, J.E., S. Yanari und K. Bloch (1953) Synthesis of glutathione from γ -glutamylcysteine, *J. Biol. Chem.*, 201, 573.

Süßmuth, R. und F. Lingens (1969) Zum Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG) bei der Mutationsauslösung; Beständigkeit des NNMG, Beziehungen zwischen Mutationsrate und Aufnahme des Mutagens durch die Zelle und Förderung der Methylierung durch Sulfhydrylgruppen in Abhängigkeit vom pH-Wert, *Z. Naturforschg.*, 24b, 903-910.

Summer, K.H. und W. Göggelmann (1980) 1-chloro-2,4-dinitrobenzene depletes glutathione in rat skin and is mutagenic in *Salmonella typhimurium*, *Mutat. Res.*, 77, 91-93.

Summer, K.H., W. Göggelmann and H. Greim (1980) Glutathione and glutathione S-transferases in the *Salmonella* mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res.*, 70, 269-278.

Tamba, M. und M. Quintiliani (1984) Pulse radiolytic studies of hydrogen transfer from glutathione to organic radicals, *Inter. J. Radiat. Biol.*, 41, 595-602.

Tate, S.S. and A. Meister (1974) Interaction of γ -glutamyl-transpeptidase with amino acids, dipeptides and derivatives and analogs of glutathione, *J. Biol. Chem.*, 249, 7593-7602.

Taylor, M.R. (1978) Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenic observations. *Mutat. Res.*, 50, 407-418.

Thommel, J. (1976) Untersuchungen über die Bedeutung von Glutathion im Stoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae*, *Dissertationsarbeit*, TU Berlin.

Tietze, F. (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Application to mammalian blood and other tissues, *Anal. Biochem.*, 27, 502-522.

Tsuboi, M., K. Kondo und N. Yanagishima (1974) Inhibition of sporulation by ethidium bromide and its reversal by fermentable sugars in Saccharomyces cerevisiae, *Arch. Microbiol.*, 99, 295-305.

Venitt, S. und J.M. Parry (1984) Mutagenicity testing. A practical approach. Oxford: IRL Press.

Vos, O., G.A. Grant und L. Budke (1976) Radiosensitization of mammalian cells by diamide, *Intern. J. Radiat. Biol.*, 29, 513-522.

Ward, J.F. (1983) Chemical aspects of DNA radioprotection. In: Radioprotectors and Anticarcinogens (Eds.: O.F. Nygaard and M. Simic), 73-85. New York: Academic Press.

Warren, S.T., D.J. Dolittle, Chie-cheng Chang, J.I. Goodman and J.E. Trosko (1982) Evaluation of the carcinogenic potential of 2,4-dinitrofluorobenzene and its implication regarding mutagenicity testing, *Carcinogenesis*, 3, 2, 139-145.

Webb, J.L. (1966) Enzyme and metabolic inhibitors, Vol. III, 285-335. New York: Academic Press.

Wellner, V.P., M.E. Anderson, R.N. Puri, G.L. Jensen und A. Meister (1984) Radioprotection by glutathione ester: transport of glutathione ester into human lymphoid cells and fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 4732-4735.

Williamson, D.H. and D.J. Fennel (1975) The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA, *Methods Cell Biol.*, 12, 335-351.

Zimmermann, K. (1975) A yeast strain for simultaneous detection of induced mitotic crossing over, mitotic gene conversion and reverse mutation, *Mutat. Res.*, 28, 381-388.

Zimmermann, F.K., V.W. Mayer und J.M. Parry (1982) Genetic toxicology studies using Saccharomyces cerevisiae, *J. Appl. Toxicol.*, 2, 1-10.

Zimmermann, F.K., R.C. von Borstel, E.S. von Halle, J.M. Parry, D. Siebert, G. Zetterberg, R. Barale and N. Loprieno (1984) Testing of chemicals for genetic activity with Saccharomyces cerevisiae: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.*, 133, 199-244.

